



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

BRUNO DE OLIVEIRA MENDES

**INFLUÊNCIA DO SOLO NA COMUNIDADE BACTERIANA
ASSOCIADA A RAÍZES DE FEIJÃO (*Phaseolus vulgaris* L.)**

Londrina
2020

BRUNO DE OLIVEIRA MENDES

**INFLUÊNCIA DO SOLO NA COMUNIDADE BACTERIANA
ASSOCIADA A RAÍZES DE FEIJÃO (*Phaseolus vulgaris* L.)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Elisete Pains Rodrigues

Londrina
2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de

M538 Mendes, Bruno de Oliveira.

Influência do solo na comunidade bacteriana associada a raízes de feijão
(Phaseolus vulgaris L.) / Bruno de Oliveira Mendes. - Londrina, 2020.
64 f.

Orientador: Elisete Pains Rodrigues.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade
Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-
Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2020.

Inclui bibliografia.

1. bactérias associativas - Tese. 2. feijão - Tese. 3. diversidade - Tese. 4. solo
- Tese. I. Rodrigues, Elisete Pains. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro
de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia
Molecular. III. Título.

CDU 575.1

BRUNO DE OLIVEIRA MENDES

**INFLUÊNCIA DO SOLO NA COMUNIDADE BACTERIANA
ASSOCIADA A RAÍZES DE FEIJÃO (*Phaseolus vulgaris* L.)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof^a. Dr^a. Elisete Pains Rodrigues
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof^a. Dr^a. Gislayne Trindade Vilas-Boas
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof^a. Dr^a. Jesiane Stefania da Silva Batista
Universidade Estadual de Ponta Grossa –
UEPG

Londrina, 20 de fevereiro de 2020.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Londrina (UEL), Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR) e à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) e seus respectivos professores, alunos e funcionários que se mostraram sempre à disposição;

À CAPES e CNPq pelo apoio financeiro;

Aos professores e funcionários dos departamentos de Biologia Geral e Bioquímica pelos ensinamentos;

Aos membros da banca;

À Prof^a Dr^a Elisete Pains Rodrigues pela disponibilidade, paciência e ensinamentos para a contribuição da minha formação acadêmica e pessoal.

A Sara Godoy, que me auxiliou desde do início com dicas nas metodologias, principalmente no sequenciamento e também pela amizade que levarei para a toda a vida.

Ao pessoal do LAGEM, Giovana, Jéssica e Gilberto pela ajuda e companhia, além das conversas que renderam boas risadas e pensamentos para a vida.

Ao Tales que foi um companheiro durante altas horas de experimentos e por dividir comigo tanto as conquistas quanto os erros durante todo o mestrado.

A Clarieze que sempre se fez presente desde o começo, ajudando principalmente na parte emocional e dando as lições de segunda mãe que precisei ouvir em diversos momentos e que sempre terá um local especial no meu coração. Obrigado!

A Jéssica da UEPG, como ficou conhecida, que apareceu no finalzinho do mestrado no laboratório, mas que trouxe uma alegria muito grande nesses momentos finais. As histórias doidas compartilhadas, risadas e pela companhia durante os experimentos que davam mais errado do que certo e que nos deixavam “o saci”, como sempre dizia.

A minha família, em especial a minha mãe Neide e minha vó Elza por todo apoio, que mesmo não entendendo tudo que estava acontecendo ou ouvindo minhas

reclamações sobre os experimentos sempre se mantiveram firme e me proporcionaram uma base que foi essencial para meu crescimento em todos os sentidos. Amo vocês para sempre!

A Débora que também foi uma parceira incrível, que era uma das poucas pessoas que entendiam meus devaneios nos momentos mais loucos que eu passei. Obrigado por tudo!

Ao Luís Santana que me ensinou muito sobre quem devemos ser e como devemos seguir, a todo o aprendizado e papos cabeças, pela companhia em diversos momentos e pela experiência de dividir a convivência na nossa “Mansão” como chamávamos a república. Serei sempre grato pela sua amizade.

Um obrigado especial para o Matheus Sanches que mesmo entre várias brigas e desavenças não deixávamos o outro passar sufoco e que aprendi muito com os erros e acertos que passamos juntos, agradeço por todo apoio que necessitei ter num lugar tão complicado e que ajudou muito a ser mais agradável. Por tudo que passamos, momentos bons ou ruins você faz parte de cada vitória. Obrigado!

MENDES, Bruno de Oliveira. **Influência do solo na comunidade bacteriana associada a raízes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)**. 2020. 66 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, 2020.

RESUMO

Partindo da ideia de que as bactérias associativas às raízes de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) contribuem diretamente para o crescimento vegetal, é de suma importância identificar a relação e a diversidade bacteriana de espécies que possuem essa capacidade. No entanto, essa microbiota é diretamente influenciada pela composição química e física do solo. A caracterização dessa diversidade em solos de ambientes inexplorados, tais como os de reservas naturais é de suma importância na descoberta de novas bactérias de interesse biotecnológico que podem beneficiar a associação entre feijoeiro-bactéria. Assim, o presente estudo teve como objetivo caracterizar a diversidade de bactérias associativas às raízes de *P. vulgaris*, além de avaliar a influência do solo nesta comunidade. Para isso, os feijões foram cultivados em casa de vegetação utilizando vasos de Leonard. Após 30 dias, as raízes foram coletadas e maceradas em solução salina 0,85% e a suspensão obtida foi diluída, plaqueada e colônias distintas foram selecionadas para a realização desse estudo. Os isolados recuperados foram identificados pela amplificação, sequenciamento e análise do gene 16S RNAr. No total, foram obtidos 77 isolados, no qual 30 pertenceram ao solo de Ortigueira, 33 de Ponta Grossa e 14 de Londrina. A comunidade bacteriana em raízes de feijão foi composta por 20 gêneros distintos, incluindo *Enterobacter*, *Rhizobium*, *Paraburkholderia*, *Burkholderia*, *Kosakonia*, *Herbaspirillum*, *Ralstonia*, *Citrobacter*, *Pantoea*, *Raoultella*, *Bacillus*, *Stenotrophomonas*, *Comamonas*, *Cupriavidus*, *Curtobacterium*, *Methylovirgula*, *Pseudomonas*, *Cellulomonas*, *Aquitalea* e *Staphylococcus*. Os gêneros predominantes foram *Enterobacter* e *Paraburkholderia*, os quais foram encontrados nos solos de Ortigueira e Ponta Grossa, respectivamente. A análise química e física dos solos revelou uma composição argilosa e com uma alta taxa de alumínio em Ortigueira, revelando que *Enterobacter* possui flexibilidade perante a essas características do solo. Já o solo de Ponta Grossa apresentou uma fertilidade pobre e uma acidez elevada, o que viabilizou a presença de *Paraburkholderia*, a qual possui tolerância a acidez. Conclui-se que bactérias associadas às raízes de *P. vulgaris* possuem alta diversidade, exemplificada pela diversidade de gêneros identificados nesse estudo. A característica e composição do solo foi um fator determinante nessa diversidade, pois nenhum conjunto exclusivo de bactérias foi encontrado nos três tipos de solos avaliados.

Palavras-chave: Bactérias associativas. Feijão. Diversidade. Solo.

MENDES, Bruno de Oliveira. **Influence of soil on the bacterial community associated with common bean roots (*Phaseolus vulgaris* L.)**. 2020. 66 p. Dissertation (Master's degree in Genetics and Molecular Biology) – Universidade Estadual de Londrina, 2020.

ABSTRACT

Based on the idea that bacteria associated with common bean roots (*Phaseolus vulgaris* L.) directly contribute to plant growth, it is extremely important to identify the relationship and bacterial diversity that have this capacity. However, this microbiota is directly influenced by the chemical and physical composition of the soil. The characterization of this diversity in soils of unexplored environments, such as those of natural reserves is of paramount importance in the discovery of new bacteria of biotechnological interest that may benefit the association between beans and bacteria. Thus, the present study aimed to characterize the diversity of bacteria associated with the roots of *P. vulgaris*, in addition to evaluating the influence of the soil in this community. For this, the beans were grown in a greenhouse using Leonard pots. After 30 days, the roots were collected and macerated in 0.85% saline and the suspension obtained was diluted, plated and distinct colonies were selected for this study. The recovered isolates were identified by amplification, sequencing and analysis of the 16S rRNA gene. In total, 77 isolates were obtained, of which 30 belonged to the soil of Ortigueira, 33 from Ponta Grossa and 14 from Londrina. The bacterial community in bean roots was made up of 20 distinct genera, including *Enterobacter*, *Rhizobium*, *Paraburkholderia*, *Burkholderia*, *Kosakonia*, *Herbaspirillum*, *Ralstonia*, *Citrobacter*, *Pantoea*, *Raoultella*, *Bacillus*, *Stenotrophomonas*, *Comamonas*, *Cupriavidus*, *Curtobacterium*, *Methylovirgula*, *Pseudomonas*, *Cellulomonas*, *Aquitalea* and *Staphylococcus*. The predominant genera were *Enterobacter* and *Paraburkholderia*, which were found in the soils of Ortigueira and Ponta Grossa, respectively. The chemical and physical analysis of the soils revealed a clayey composition with a high aluminum rate in Ortigueira, revealing that *Enterobacter* has flexibility in relation to these soil characteristics. The Ponta Grossa soil, on the other hand, showed poor fertility and high acidity, which made possible the presence of *Paraburkholderia*, which has tolerance to acidity. It is concluded that a high diversity of bacteria had the ability to associate with the roots of *P. vulgaris*, exemplified by the diversity of genera identified in this study. The characteristic and composition of the soil was a determining factor in this diversity, since no exclusive set of bacteria was found in the three types of soils evaluated.

Keywords: Associative bacteria. Common bean. Diversity. Soil.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Localidades dos solos de reservas naturais no Estado do Paraná	37
Tabela 2 – Análise física dos solos de reservas naturais do Estado do Paraná.....	42
Tabela 3 – Análise química dos solos de reservas naturais do Estado do Paraná.....	43
Tabela 4 – Quantidade de isolados obtidos de cada meio de cultura	43
Tabela 5 – Gêneros de bactérias obtidos de raízes de <i>P. vulgaris</i> cultivado em três solos de reservas naturais do Estado do Paraná	45
Tabela 6 – Identificação dos isolados de bactérias obtidas de raízes de <i>P. vulgaris</i> cultivado em três solos de reservas naturais do Estado do Paraná.....	46

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 – Estoques para a solução nutritiva	61
Anexo 2 – Classificação e código de acesso dos isolados obtidos de raízes de feijão (<i>P. vulgaris</i>) obtidos de três solos do Paraná	62

SUMÁRIO

1	REVISÃO DE LITERATURA	11
1.1	MICROBIOTA VEGETAL	11
1.2	FEIJÃO (PHASEOLUS VULGARIS)	15
1.3	IDENTIFICAÇÃO PELO GENE 16S RNAR.....	18
2	OBJETIVO	20
2.1	OBJETIVO GERAL	20
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21
4	ARTIGO	30
1	INTRODUÇÃO	31
2	MATERIAL E MÉTODOS	35
2.1	COLETA DO SOLO	35
2.2	ANÁLISE QUÍMICA E FÍSICA DO SOLO.....	35
2.3	CONDUÇÃO DO EXPERIMENTO UTILIZANDO FEIJOEIRO COMO PLANTA- ISCA (TRAPPING)	36
2.4	ISOLAMENTO BACTERIANO	36
2.5	CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR	37
2.5.1	Extração De Dna	37
2.5.2	Amplificação Do Gene 16s Rrna Dos Isolados.....	38
2.5.3	Purificação E Sequenciamento	39
2.6	ANÁLISE DOS DADOS	39
3	RESULTADOS	40
3.1	CARACTERIZAÇÃO DOS SOLOS	40
3.2	ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS DE RAÍZES DE FEIJOEIRO	41
3.3	SEQUENCIAMENTO PARCIAL DO GENE 16S RNAR.....	42

4	DISCUSSÃO	46
5	CONCLUSÃO	52
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

1.0 Revisão de literatura

1.1 Microbiota vegetal

A microbiota vegetal compreende todos os microrganismos presentes nas diversas regiões das plantas, como rizosfera, filosfera e endosfera, os quais podem exercer funções de grande importância para a saúde e desenvolvimento destas (HARDOIM et al., 2015).

Os tecidos vegetais que se localizam acima do solo, como folhas, flores e frutos são um ambiente de grande diversidade microbiana. Os microrganismos endofíticos podem ser transportados do xilema para caules, folhas e até mesmo frutos, ou então colonizam diretamente esses tecidos. No entanto, algumas plantas podem apresentar uma diversidade microbiana em sua parte aérea distinta da raiz (COMPANT et al., 2011).

Essa microbiota é composta por fungos, archeas e bactérias, e por questão de maior disponibilidade de informações, as bactérias são o principal enfoque dos estudos com potencial biotecnológico. Dentre os filos bacterianos mais comumente encontrados destacam-se Acidobacteria, Verrucomicrobia, Bacteroidetes, Proteobacteria, Planctomycetes e Actinobacteria (MITTER et al., 2016; FIERER, 2017).

Diversos fatores afetam essa microbiota, assim como o solo, pH, salinidade, tipo de solo, composição, umidade, matéria orgânica e exsudatos (FIERER, 2017). Já o clima, presença de patógenos e práticas antrópicas vão influenciar na microbiota presente na parte aérea da planta, afetando também a comunidade rizosférica (HARDOIM et al., 2015).

Dentre toda essa diversidade, existem bactérias que vão promover doenças na planta e outras que auxiliarão em seu desenvolvimento. As espécies de *Xanthomonas* spp, *Ralstonia* spp, *Xylella* spp e *Pseudomonas* spp, são consideradas fitopatogênicas e são comuns em batata, banana e feijão (MANSFIELD et al., 2012). Fatores como a densidade populacional desses patógenos, suscetibilidade do hospedeiro, ambiente e a microbiota da planta vão influenciar diretamente na severidade da doença e na relação planta-patógeno (BRADER et al., 2017).

Apesar da presença desses patógenos, as bactérias que podem interagir com a planta de maneira benéfica podem auxiliar no aumento da resistência desta planta

a esses patógenos, seja por interações entre as bactérias ou na modulação da defesa da planta (DE VRIEZE et al., 2018). Dentre os gêneros comuns que exercem essa função, destacam-se *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Burkholderia* e *Paraburkholderia* (SCHLATTER et al., 2017). *Enterobacter* e *Serratia* apresentaram sucesso na supressão da doença *Take-all* causada pelo fungo *Gaeumannomyces graminis var. tritici*. (DURAN et al., 2018).

Além da supressão de doenças, essas bactérias podem promover o crescimento das plantas, assim chamadas de promotoras do crescimento vegetal (PGPB), produzindo hormônios. Espécies de *Pseudomonas*, *Paraburkholderia* e *Pantoea* foram relatadas por apresentarem propriedades marcantes em raízes de trigo e soja, principalmente na produção de hormônios, solubilização de fosfatos, absorção de nutrientes e tolerância ao estresse (RASCOVAN et al., 2016).

As interações mutualísticas vêm ao decorrer do tempo sendo mais reconhecidas e essenciais para os estudos de associações bactéria-planta devido a importante função que a microbiota desempenha no ecossistema (BRUNO; STACHOWICZ; BERTNESS, 2003). A microbiota vegetal possibilita absorção de nutrientes e a eficácia do uso destes, fornecendo compostos que auxiliam no desenvolvimento vegetal além de auxiliar nas interações competitivas entre as plantas (ANTOUN et al., 1998; BUSBY et al., 2017). A diversidade de microrganismos é um importante indicador de qualidade na agricultura e garante uma riqueza biológica importante no controle de pragas e no desenvolvimento da planta, contribuindo diretamente para a produtividade e sustentabilidade das culturas agrícolas (ANDREOTI, 2009).

A interface em que essas bactérias podem se associar as plantas compreende-se rizosfera, que é definida como a região do solo adjacente sob influência da raiz, a superfície da raiz (rizoplano) e a porção interna da raiz. Nessas regiões ocorrem complexas interações planta-microrganismo. Esses microrganismos são recrutados a partir do solo pelos exsudatos liberados pelas raízes. Esses exsudatos são compostos de substratos que vão atrair as bactérias e auxiliar no recrutamento microbiano, o qual se inicia pela colonização da rizosfera e posteriormente a superfície e o interior das raízes (BULGARELLI et al., 2012).

Existem fatores que vão influenciar na presença e atividade metabólica dos microrganismos em associação com as plantas, entre estes estão fatores edáficos,

relacionados ao solo e sua composição, e genotípicos da planta (PHILIPPOT et al., 2013). Outros fatores que também vão influenciar nessa microbiota é o estágio de desenvolvimento da planta, o qual diferentes comunidades de bactérias vão ser encontrados em cada um desses estágios (CHAPARRO et al., 2013). Em relação ao genótipo da planta, estudos comprovam que também é um fator que influencia na presença de diferentes comunidades bacterianas, além dos tipos de exsudatos que cada planta secreta, resultando assim em uma relação mais específica entre bactéria-planta (BULGARELLI et al., 2015).

Fatores como a disponibilidade de água, temperatura, radiação ultravioleta e distribuição de macronutrientes estão associados a modulação dessa comunidade. Sabe-se que a baixa disponibilidade de nitrogênio e fosfatos afeta diretamente a associação de plantas leguminosas com micorrizas (OLDROYD et al., 2011). Outro exemplo foi o uso de fertilizantes nitrogenados, o qual ocasionou uma mudança na comunidade microbiana em folhas de milho e soja (MANCHING et al., 2014) e também influências bióticas como o uso de animais herbívoros que afetou a colonização de microrganismos nas plantas (DEMATHEIS et al., 2012).

Em relação ao genótipo da planta, os fitohormônios e a sinalização imunológica estão associados a formação da microbiota que a planta vai apresentar. Um estudo feito com *Arabidopsis* mostrou que o ácido salicílico foi responsável por modular a comunidade bacteriana em suas raízes (LEBEIS et al., 2015). Um outro estudo avaliou uma *Arabidopsis* que possuía uma mutação no gene que codificava para o ácido jasmônico e observou que a comunidade bacteriana desta era diferente da *Arabidopsis* selvagem (CARVALHAIS et al., 2015).

Os rizóbios tem um importante papel na promoção de serviços ecossistêmicos, que são bens e serviços exercidos pelos próprios ecossistemas, beneficiando o planeta e sua preservação – direta e indiretamente – para a agricultura moderna, pois a sua capacidade de associação simbiótica com plantas tanto leguminosas quanto não leguminosas promove a FBN (ORRELL; BENNETT, 2013). Essa característica trouxe uma prática agrícola sustentável e rentável, como por exemplo os biofertilizantes, principalmente para os pequenos agricultores, tendo um impacto benéfico no aumento da produtividade e do custo-benefício (MENG et al., 2015).

A FBN auxilia com mais de 100 milhões de toneladas de nitrogênio para diversos ecossistemas presentes no solo, e o aproveitamento desse fenômeno pode trazer uma redução de gastos com fertilizantes utilizando-se rizóbios, que fornecem 50% a mais de aproveitamento do N para a produção agrícola (RAKASH; RANA, 2013).

As bactérias presentes no solo colonizam a rizosfera e o rizoplane a partir de exsudatos radiculares que por elas são liberados. Sabe-se que parte do carbono absorvido na fotossíntese é levado para as raízes e então liberado como exsudato (BAIS et al., 2006). Esses exsudatos incluem diversos carboidratos, aminoácidos e outros compostos, os quais fornecem nutrientes para as bactérias presente naquela região do solo. Assim, as bactérias recebem a sinalização química e se direcionam até esses exsudatos, propiciando a colonização tanto da rizosfera quanto do rizoplane (LUGTENBERG; KAMILOVA, 2009).

Essas associações entre bactéria-hospedeiro envolvem interações específicas de reconhecimento entre ambos. A composição dos exsudatos, exposição da planta a algum tipo de estresse, o estágio de desenvolvimento da planta e até mesmo o desenvolvimento estrutural da raiz proporcionam uma diversidade bacteriana (LUGTENBERG et al., 2001). Devido a sua composição, alguns exsudatos apresentam efeito negativo em algumas bactérias, principalmente na expressão gênica (BAIS et al., 2006).

Existem regiões na raiz que possuem uma maior concentração de exsudatos do que outras, como por exemplo a zona de capilares, o que propicia uma colonização bacteriana maior nessa região quando comparada a colonização das pontas distais da raiz (GRAYSTON et al., 1996).

Estudos realizados em condições hidropônicas relatam que o processo de exsudação é bidirecional, ou seja, as plantas têm a capacidade de absorver diversos compostos presentes na rizosfera e transferir novamente para novos brotos, influenciando assim no exsudato disponível para a colonização (JONES; DARRAH, 1994, 1995, 1996; JONES et al., 2009).

A relação simbiótica entre rizóbios e leguminosas é um exemplo de associação específica. Em relação ao genótipo da planta, estudos comprovam que

este também é um fator que influencia na presença de diferentes comunidades bacterianas, além dos tipos de exsudatos que cada planta secreta, resultando assim em uma relação mais específica entre as bactérias e as plantas (BULGARELLI et al., 2015). Portanto, há necessidade de determinar a diversidade presente em cada grupo de leguminosas para então reconhecer e explorar os benefícios desta associação. A distribuição destas bactérias e a sua diversidade é diretamente afetada pela localização geográfica, que é um fator que pode ser determinante da filogenia e possível origem de evolução (BATISTA et al., 2015; LEMAIRE et al., 2015).

A simbiose entre o rizóbios e plantas leguminosas resulta na formação do nódulo na raiz, uma estrutura especializada onde a bactéria simbiótica realiza a fixação biológica do nitrogênio (FBN). A interação se dá a partir de pêlos radiculares presentes nas raízes e que possuem um papel importante na simbiose, pois são eles que vão ser os responsáveis pela liberação dos exsudatos e é onde ocorre a entrada das bactérias no interior da raiz (PERRET et al., 2000; POPP; OTT, 2011). A formação do nódulo se dá pela entrada das bactérias no citoplasma das células vegetais onde ocorre um alto crescimento bacteriano e mudando sua forma de bastonete para um formato em Y, quando ocorre essa diferenciação ela se torna um bacteroide, esse crescimento continua a ocorrer até extravasar as células vegetais formando assim o nódulo (PAAU et al., 1980; VASSE et al., 1990).

Atualmente as bactérias com capacidade de produzir nódulos pertencem a classe α -Proteobacteria, com os gêneros *Bradyrhizobium*, *Mehorhizobium*, *Rhizobium*, *Ensifer*, *Phyllobacterium* e *Microvirga* (MOKHTAR et al., 2019) e β -Proteobacteria, com os gêneros de *Paraburkholderia*, *Burkholderia* e *Cupriavidus* (BONTEMPS et al., 2010).

1.2 Feijão (*Phaseolus vulgaris*)

O feijão comum pertence à família Leguminosae, gênero *Phaseolus*, espécie *Phaseolus vulgaris* L., e é considerado um dos alimentos em maior quantidade em todo o território nacional, sendo cultivado em diversos países. As espécies selvagens estão distribuídas geograficamente na Mesoamérica e América do Sul, no qual a sua domesticação teve origem na Mesoamérica e nos Andes, sendo bem adaptado a climas úmidos e temperados (BITOCCHI et al., 2017). O Brasil possui

destaque pela sua domesticação e diversidade genética desta espécie (BURLE et al., 2010).

O feijão tem um papel importante na dieta alimentar da população e também para os pequenos produtores que fazem o uso do manejo da cultura para a comercialização e próprio consumo. O consumo deste é feito desde as folhas, até mesmo a palha e vagens, além do mais comum que são os seus grãos. Pequenos produtores e famílias de baixa renda são os principais consumidores devido ao seu alto valor proteico que chega até 33% (ADAMS et al., 1980; BASSINELLO, 2018).

A produção desse grão é bastante difundida em todo o território nacional e distribuída em três safras ao longo do ano, sendo o Brasil o terceiro maior produtor mundial (CONAB, 2018) com um rendimento de 3,6 milhões de toneladas, sendo a região Sul do País a líder de produção com um rendimento de 798 mil toneladas. O fator determinante do pequeno fluxo internacional é justificado pelo fato dos grandes produtores serem também os grandes consumidores do produto, o que limita a quantidade a ser exportada. (CONAB, 2018).

A produção de feijão de um modo geral é afetada pelo manejo incorreto de técnicas agrônomicas e deficiência nutricional, particularmente a de nitrogênio, acarretando o uso de fertilizantes nitrogenados para suprir essa necessidade. Contudo, o alto custo destes insumos afeta diretamente os pequenos produtores, os quais são os principais produtores de feijão (KAWAKA et al., 2018). O feijão apresenta deficiência na absorção do nitrogênio, principalmente em relação aos fertilizantes nitrogenados, os quais são utilizados em muitas áreas de cultivo (ROSAS et al., 1998). Esse fato acaba por limitar a sua produção, principalmente na agricultura de subsistência dos países em desenvolvimento, pois estes possuem acesso limitado aos insumos externos e ao alto custo destes (THUNG, 1991). Dentre outros problemas que afetam a produção do feijão, destacam-se a predação por insetos, doenças e fatores abióticos. Tendo em vista todo esse cenário, diversas abordagens biotecnológicas estão sendo aplicadas, como cultivares melhoradas e transgênicas (OECD, 2016).

Em relação a deficiência de nitrogênio, o Brasil apresenta diversos solos com essa característica, o que torna necessário o uso de bactérias capazes de fixarem o nitrogênio. Essa alternativa é considerada de baixo custo, porém um fator que limita

esse progresso é a baixa nodulação e resposta a inoculação dos experimentos realizados em campo em diversos locais, o que traz uma preocupação quanto a eficácia da nodulação em feijão (GRAHAM, 1981; PEREIRA et al., 1984; BUTTERY et al., 1987; HARDARSON, 1993). Essa falha na resposta da inoculação está associada às características da planta e da bactéria e principalmente aos fatores ambientais que vão interferir na simbiose (HUNGRIA et al., 1997).

A promiscuidade do feijão é uma característica marcante, pois a partir desta ele tem capacidade de se associar com diversas bactérias simbiotes, o que resulta em uma alta taxa de diversidade dessas rizobactérias (MICHIELS et al., 1998). Esse fator agrava mais ainda a fixação de nitrogênio no feijão, pois a presença de diversas espécies bacterianas capazes de se associarem ao feijão é grande, com isso há uma competitividade maior (FUENTES et al., 2002; BAGINSKY et al., 2015). No entanto, para ocorrer o sucesso simbiótico entre o feijão-bactéria é necessário uma especificidade, compatibilidade e eficiência da bactéria com a planta, além de condições favoráveis de ambiente e solo (NAVEED et al., 2015).

Dentre as espécies mais comum que estabelecem interação simbiótica com *P. vulgaris* destacam-se *Rhizobium etli*, *R. gallicum*, *R. giardinii*, *R. leguminosarum*, *R. lusitanum*, *R. phaseoli*, *R. vallis*, *R. leucaenae*, *R. tropici*, *R. mesoamericanum*, *R. freirei*, *R. azibense*, *Ensifer meliloti*, *Ensifer americanum* e *Bradyrhizobium* spp (VERÁSTEGUI-VALDÉS et al., 2014).

Os rizóbios simbióticos de *P. vulgaris* apresentam distribuição geográfica com padrão distinto, sendo *R. etli* predominante na América do Sul e Central, Europa e Jordânia (GARCIA-FRAILE et al., 2010), *R. leguminosarum* é a principal espécie nos Andes e no Nepal (RIBEIRO et al., 2013), *R. tropici* está presente em regiões que possuem solos mais ácidos e de alta temperatura (GRANGE; HUNGRIA, 2004), *R. phaseoli* e *R. etli* são grupos comumente presentes na África (ASERSE et al., 2012), e por fim *Ensifer* spp são exclusivamente de solos salinos e alcalinos (MNASRI et al., 2012).

Dentre as espécies que obtiveram um maior sucesso de simbiose com o feijão, destacam-se *R. tropici*, *R. leucaenae*, *R. freirei*, e *R. paranaense* por obterem uma maior estabilidade genética (MARTÍNEZ-ROMERO et al., 1991). Tendo em vista essas observações, as espécies *R. tropici* e *R. freirei* foram propostas como

inoculantes comerciais de grande interesse agrônomo, pois estas estirpes possuem uma maior resistência à temperatura, toxicidade de alumínio e acidez (HUNGRIA et al., 2003).

Diversas estirpes de rizóbios se diferenciam em relação a sua capacidade de nodular, fixar nitrogênio e de sobrevivência em diversos tipos de solos. Considerando essa adaptação de rizóbios nativos, torna-se de grande interesse a caracterização destes para o desenvolvimento de novos inoculantes (SLATTERY et al., 2001), principalmente linhagens eficientes que vão competir com as populações bacterianas já presentes no solo (GILLER, 2001).

1.3 Identificação de bactérias pelo gene 16S RNAr

A utilização de sequências do gene 16S RNAr é considerada o marcador mais utilizado para a identificação de filogenia e taxonomia bacteriana. Dentre as características que tornam o gene 16S RNAr uma boa escolha para a identificação bacteriana, destaca-se a sua presença na maioria das bactérias como uma família multigênica ou em operons. Além disso, esse gene é considerado conservado, sugerindo que mutações aleatórias nesse gene são de caráter evolutivo. O seu tamanho (1500 pb) também é uma característica positiva, pois é grande o suficiente para estudos de bioinformática (PATEL, 2001).

As sequências de nucleotídeos são classificadas por uma porcentagem de identidade, ou seja, o número de nucleotídeos idênticos que são compartilhados pela sequência de referência com a sequência consultada dividido pelos números de nucleotídeos sequenciados. O percentual de identidade aceitável para as bactérias identificadas por meio do 16S RNAr é de 97% para classificação em nível de gênero e 99% para espécies (RELLER et al., 2007).

As divergências em relação a classificação pelo gene 16S RNAr estão ligadas ao baixo poder filogenético a nível de espécie e baixo poder discriminatório para alguns gêneros, por isso torna-se necessário estudos de relação com o DNA para suprir esses problemas na classificação taxonômica (BOSSHARD et al., 2006). A partir desse fato os dados dessa sequência não podem ser utilizados como uma resposta definitiva quanto a distinção de espécies (PETTI, 2007).

A taxonomia de bactérias tem evoluído com o desenvolvimento de novos métodos e ferramentas, principalmente moleculares. Inicialmente, a classificação taxonômica considerava dados morfológicos e bioquímicos dos microrganismos

além da caracterização quimiotaxonômica e genotípica (COLWELL, 1970). Assim, essa abordagem foi aprimorada e nomeada de taxonomia polifásica, sendo uma classificação mais completa por agrupar várias informações fenotípicas, filogenéticas e genotípicas (VANDAMME et al., 1996).

Uma espécie bacteriana é pertencente a um grupo através do grau de similaridade genética que apresentam, esses dados fenotípicos são adquiridos através de análises da expressão gênica, função das proteínas, marcadores quimiotaxonômicos e outras características do funcionamento dos genes (RIVAS et al., 2009).

Dentre as metodologias utilizadas na taxonomia polifásica destacam-se a análise G + C mol% no DNA, hibridização DNA-DNA (DDH), polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RFLP), eletroforese em campo pulsado (PFGE), sequenciamento e técnicas de PCR *fingerprint* (STACKEBRANDT et al., 2002). Mas algumas dessas técnicas possuem limitações, devido ao alto custo e baixa reprodutibilidade, até mesmo um banco de dados completo para que se realize a comparação (RAMOS et al., 2011).

2.0 Objetivos

2.1 Objetivo geral

- Avaliar a diversidade de bactérias associativas a raízes de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivado em três solos de reservas naturais no estado do Paraná.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar o cultivo de plantas-isca (*trapping*) de feijão em casa de vegetação utilizando solos de reservas naturais do Paraná;
- Obter isolados de bactérias associativas de raízes de feijão;
- Amplificar e sequenciar o gene 16S RNAr dos isolados obtidos;
- Identificar os isolados a nível de gênero pela análise das sequências parciais do 16S rRNA;
- Comparar a diversidade de bactérias cultiváveis obtidas dos diferentes solos;

3.0 Referências Bibliográficas

ADAMS, M. W. **Energy inputs in dry bean production**. Boca Raton, FL, USA: 1980; p. 123–126.

ANDREOTI, F. D.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Assessing the diversity of bacterial communities associated with plants. **Braz. J. Microbiol.**, v. 40, p. 417-432, 2009.

ANTOUN, H.; BEAUCHAMP, C. J.; GOUSSARD, N.; CHABOT, R.; LALANDE, R. Potential of Rhizobium and Bradyrhizobium species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: effects on radishes (*Raphanus sativus* L.). **Plant Soil**, v. 204, p. 57–67, 1998.

ASERSE, A. A.; RÄSÄNEN, L. A.; ASSEFA, F.; HAILEMARIAM, A.; LINDSTRÖM, K. Phylogeny and genetic diversity of native rhizobia nodulating common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Ethiopia. **Sys. and App. Mic.**, v. 35, n. 2, p. 120–131, 2012.

BAGINSKY, C.; BRITO, B.; SCHERSON, R.; PERTUZÉ, R.; SEGUEL, O.; CAÑETE, A.; ARANEDA, C.; JOHNSON, W. E. Genetic diversity of *Rhizobium* from nodulating beans grown in a variety of Mediterranean climate soils of Chile. **Arc. of Mic.**, v. 197, n. 3, p. 419-429, 2015.

BAIS, H. P.; WEIR, T. L.; PERRY, L. G.; GILROY, S.; VIVANCO, J. M. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 57, n. 1, p. 233–266, 2006.

BASSINELLO, C. Z. Adubação. Arvore do conhecimento: Feijão. **Agência Embrapa de Informação Tecnológica**, 2018.

BATISTA, L.; IRISARRI, P.; REBUFFO, M.; CUITIÑO, M. J.; SANJUÁN, J.; MONZA, J. Nodulation competitiveness as a requisite for improved rhizobial inoculants of *Trifolium pratense*. **Biol. Fertil. Soils**, v. 51, p. 11–20, 2015.

BITOCCHI, E.; RAU, D.; BELLUCCI, E.; RODRIGUEZ, M.; MURGIA, M. L.; GIOIA, T.; SANTO, D.; NANNI, L.; ATTENE, G.; PAPA, R. Beans (*Phaseolus* ssp.) as a

Model for Understanding Crop Evolution. **Frontiers in plant science**, v. 8, n. 722, 2017.

BONTEMPS, C.; ELLIOTT, G. N.; SIMON, M. F.; DOS REIS JUNIOR, F. B.; GROSS, E.; LAWTON, R. C. Burkholderia species are ancient symbionts of legumes. **Mol. Ecol.**, v. 19, p. 44–52, 2010.

BOSSHARD, P. P.; ZBINDEN, R.; ABELS, S.; BODDINGHAUS, B.; ALTWEGG, M.; BOTTGER, E. C. 16S rRNA gene sequencing versus the API 20 NE system and the Vitek 2 ID-GNB card for identification of nonfermenting gramnegative bacteria in the clinical laboratory. **J. Clin. Microbiol.**, v. 44, p. 1359–1366, 2006.

BRADER, G.; COMPANT, S.; VESCIO, K.; MITTER, B.; TROGNITZ, F.; MA, L. J. Ecology and genomic insights into plant-pathogenic and plant-nonpathogenic endophytes. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v. 55, p. 61–83, 2017.

BRUNO, J. F.; STACHOWICZ, J. J.; BERTNESS, M. D. Inclusion of facilitation into ecological theory. **Tren. Ecol. Evol.**, v. 18, p. 119–125, 2003.

BULGARELLI, D.; GARRIDO-OTER, R.; MÜNCH, P. C.; WEIMAN, A.; DRÖGE, J.; PAN, Y.; MCHARDY, A. C.; SCHULZE-LEFERT, P. Structure and function of the bacterial root microbiota in wild and domesticated barley. **Cell Host Microbe**, v. 17, p. 392–403, 2015.

BULGARELLI, D.; ROTT, M.; SCHLAEPPI, K.; THEMAAT, E. V. L.; AHMADINEJAD, N.; ASSENZA, F.; RAUF, P.; HUETTEL, B.; REINHARDT, R.; SCHMELZER, E. Revealing structure and assembly cues for *Arabidopsis* root-inhabiting bacterial microbiota. **Nature**, v. 488, p. 91–95, 2012.

BURLE, M. L.; FONSECA, J. R.; KAMI, J. A.; GEPTS, P. Microsatellite diversity and genetic structure among common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces in Brazil, a secondary center of diversity. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 121, n. 5, p. 801-813, 2010.

BUSBY, P. E.; SOMAN, C.; WAGNER, M. R.; FRIESEN, M. L.; KREMER, J.; BENNETT, A.; MORSY, M.; EISEN, J. A.; LEACH, J. E.; DANGL, J. L. Research

priorities for harnessing plant microbiomes in sustainable agriculture. **PLoS Biol.**, v. 15, 2017.

BUTTERY, B. R.; PARK, S. J.; FINDLAY, W. J. Growth and yield of white bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in response to nitrogen, phosphorus and potassium fertilizer and to inoculation with *Rhizobium*. Can. **J. of Plant Sci.**, v. 67, p. 425-432, 1987.

CARVALHAIS, L. C.; DENNIS, P. G.; BADRI, D. V.; KIDD, B. N.; VIVANCO, J. M.; SCHENK, P. M. Linking jasmonic acid signaling, root exudates, and rhizosphere microbiomes. **Mol. Plant-Microbe Interact.**, v. 28, p. 1049–1058, 2015.

CHAPARRO, J. M.; BADRI, D, V.; VIVANCO, J. M. Rhizosphere microbiome assemblage is affected by plant development. **ISME J.**, v. 8, p. 790–803, 2013.

COLWELL, R. R. Polyphasic Taxonomy of the Genus *Vibrio*: Numerical Taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and Related *Vibrio* Species. **J. of Bac.**, v. 104, n. 1, p. 410-433, 1970.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Perspec. agropec.**, v.6, p. 1-112, 2018.

COMPANT, S.; MITTER, B.; COLLI-MULL, J. G.; GANGL, H.; SESSITSCH, A. Endophytes of grapevine flowers, berries, and seeds: identification of cultivable bacteria, comparison with other plant parts, and visualization of niches of colonization. **Microb. Ecol.**, v. 62, p. 188–97, 2011.

DE VRIEZE, M.; GERMANIER, F.; VUILLE, N.; WEISSKOPF, L. Combining different potato-associated *Pseudomonas* strains for improved biocontrol of *Phytophthora infestans*. **Front. Microbiol.**, v. 9, p. 2573, 2018.

DEMATHEIS, F.; ZIMMERLING, U.; FLOCCO, C.; KURTZ, B.; VIDAL, S. Multitrophic interaction in the rhizosphere of maize: root feeding of Western Corn Rootworm larvae alters the microbial community composition. **PLOS ONE**, v. 7, 2012.

DURAN, P.; TORTELLA, G.; VISCARDI, S.; BARRA, P. J.; CARRIÓN, V. J.; MORA, L. A. Microbial community composition in take-all suppressive soils. **Front. Microbiol.**, v. 9, p. 2198, 2018.

FIERER, N. Embracing the unknown: disentangling the complexities of the soil microbiome. **Nature Rev. Microbiol.**, v. 15, p. 579–90, 2017.

FUENTES, J. B.; ABE, M.; UCHIUMI, T.; SUZUKI, A.; HIGASHI, S. Symbiotic root nodule bacteria isolated from yam bean (*Pachyrhizus erosus*). **J. of Gen. and App. Mic.**, v. 48, p. 181-191, 2002.

GARCIA-FRAILE, P.; MULAS-GARCIA, D.; PEIX, A.; RIVAS, R.; GONZALEZ-ANDRES, F.; VELAZQUEZ, E. Phaseolus vulgaris is nodulated in northern Spain by Rhizobium leguminosarum strains harboring two nodC alleles present in American Rhizobium etli strains: biogeographical and evolutionary implications. **Can. J. Microbiol.**, v. 56, p. 657–666, 2010.

GILLER, K. E. Nitrogen fixation in tropical cropping systems. CABI Publishing, Wallingford: 2001.

GRAHAM, P. H. Some problems of nodulation and symbiotic nitrogen fixation in Phaseolus vulgaris L.: a review. **Fit. Crop. Res.**, v. 4, p. 93-112, 1981.

GRANGE, L.; HUNGRIA, M. Genetic diversity of indigenous common bean (Phaseolus vulgaris) rhizobia in two Brazilian ecosystems. **Soil. Biol. Biochem.**, v. 36, p. 1389–1398. 2004.

GRAYSTON, S. J.; VAUGHAN, D.; JONES, D. Rhizosphere carbon flow in trees, in comparison with annual plants: the importance of root exudation and its impact on microbial activity and nutrient availability. **App. Soil Eco.**, v. 5, p. 29-56, 1996.

HARDARSON, G. Methods for enhancing symbiotic nitrogen fixation. **Plant and Soil**, v. 152, p. 1-17, 1993.

HARDOIM, P. R.; VAN OVERBEEK, L. S.; BERG, G.; PIRTTILÄ, A. M.; COMPANT, S.; CAMPISANO, A. The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. **Mic. Mol. Bio. Rev.**, v. 79, p. 293–320, 2015.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J; MENDES, I. C. Benefits of inoculation of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) crop with efficient and competitive *Rhizobium tropici* strains. **Biol. Fert. Soils**, v. 39, n. 2, p. 88–93, 2003.

HUNGRIA, M.; STACEY, G. Molecular signals exchanged between host plants and rhizobia: Basic aspects and potential application in agriculture. **Soil Bio. & Bio.**, v. 29, p. 819-830, 1997.

JONES, D. L.; DARRAH, P. R. Amino-acid influx at the soil-root interface of *Zea mays* L. and its implications in the rhizosphere. **Plant and Soil**, v. 163, p. 1-12, 1994.

JONES, D. L.; DARRAH, P. R. Influx and efflux of organic-acids across the soil-root interface of *Zea mays* L. and its implications in rhizosphere C flow. **Plant and Soil**, v. 173, p. 103-109, 1995.

JONES, D. L.; DARRAH, P. R. Re-sorption of organic compounds by roots of *Zea mays* L. and its consequences in the rhizosphere. 3. Characteristics of sugar influx and efflux. **Plant and Soil**, v. 178, p. 153-160, 1996.

JONES, D. L.; NGUYEN, C.; FINLAY, R. D. Carbon flow in the rhizosphere: carbon trading at the soil and root interface. **Plant and Soil**, v. 321, p. 5-33, 2009.

KAWAKA, F.; DIDA, M.; OPALA, P.; OMBORI, O.; MAINGI, J.; AMODING, A. Effect of nitrogen sources on the yield of common bean (*Phaseolus vulgaris*) in western Kenya. **Journal of Plant Nutrition.**, v. 41, n. 13, p. 1652–61, 2018.

LEBEIS, S. L.; PAREDES, S. H.; LUNDBERG, D. S.; BREAKFIELD, N.; GEHRING, J. Salicylic acid modulates colonization of the root microbiome by specific bacterial taxa. **Science**, v. 349, p. 860–864, 2015.

LEMAIRE, B.; DLODLO, O.; CHIMPHANGO, S.; STIRTON, C.; SCHRIRE, B.; BOATWRIGHT, J. S. Symbiotic diversity, specificity and distribution of rhizobia in native legumes of the Core Cape Sub-region (South Africa). **FEMS Microbiol. Ecol.**, v. 91, p. 1–17, 2015.

LUGTENBERG, B. J. J.; DEKKERS, L.; BLOEMBERG, G. V. Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas*. **Annual Rev. of Phytopath.**, v. 39, p. 461-490, 2001.

LUGTENBERG, B.; KAMILOVA, F. Plant-growth-promoting rhizobacteria. **Annual Rev. of Mic.**, v. 63, p. 541-556, 2009.

MANCHING, H. C.; BALINT-KURTI, P. J.; STAPLETON, A. E. Southern leaf blight disease severity is correlated with decreased maize leaf epiphytic bacterial species richness and the phyllosphere bacterial diversity decline is enhanced by nitrogen fertilization. **Front. Plant Sci.**, v. 5, p. 403, 2014.

MANSFIELD, J.; GENIN, S.; MAGORI, S.; CITOVSKY, V.; SRIARIYANUM, M.; RONALD, P. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. **Mol. Plant. Pathol.**, v. 13, p. 614–629, 2012.

MARTÍNEZ-ROMERO, E.; SEGOVIA, L.; MERCANTE, F.M.; FRANCO, A. A.; GRAHAM, P.; PARDO, M. A. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* spp. trees. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 41, p. 417-26, 1991.

MENG, L.; ZHANG, A.; WANG, F.; HAN, X.; WANG, D.; LI, S. Arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobium facilitate nitrogen uptake and transfer in soybean/maize intercropping system. **Front. Plant Sci.**, v. 6, p. 339, 2015.

MICHIELS, J.; DOMBRECHT, B.; VERMEIREN, N.; XI, C.; LUYTEN, E.; VANDERLEYDEN, J. *Phaseolus vulgaris* is a non-selective host for nodulation. **FEMS Microbiol. Ecol.**, v. 26, p. 193-205, 1998.

MITTER, B.; PFAFFENBICHLER, N.; SESSITSCH, A. Plant–microbe partnerships in 2020. **Microb. Biotechnol.**, v. 9, p. 635–40, 2016.

MNASRI, B.; SAIDI, S.; CHIHAOUI, S. A.; MHAMDI, R.; *Ensifer americanum* symbiovar *mediterraneanense* is a predominant symbiont that nodulates and fixes

nitrogen with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in a Northern Tunisian field. **Syst. Appl. Microbiol.**, v. 35, p. 263–269, 2012.

MOKHTAR, REJILI, MOHAMED ALI BENABDERRAHIM AND MOHAMED MARS. Phylogenomic Review of Root Nitrogen-Fixing Symbiont Population Nodulating Northwestern African Wild Legumes. **IntechOpen**, 2019.

NAVEED, M. Perspectives of rhizobial inoculation for sustainable crop production. **Applied Facets**, p. 209-239, 2015.

NAVEED, M.; BROWN, L. K.; RAFFAN, A. C. Plant exudates may stabilize or weaken soil depending on species, origin and time: Effect of plant exudates on rhizosphere formation. **Euro. J. of Soil Sci.**, v. 68, p. 806–816, 2017.

OECD (The Organization for Economic Co-operation and Development). **Safety Assessment of Transgenic Organisms in the Environment**. Paris: 2016.

OLDROYD, G. E. D.; MURRAY, J. D.; POOLE, P. S.; DOWNIE, J. A. The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. **Annu. Rev. Genet.**, v. 45, p. 119–44, 2011.

ORRELL, P.; BENNETT, A. E. How can we exploit above-belowground interactions to assist in addressing the challenges of food security? **Front. Plant Sci.**, v. 4, p. 432, 2013.

PAAU, A. S.; BLOCH, C.B.; BRILL, W. J. Developmental fate of *Rhizobium meliloti* bacteroids in alfalfa nodules. **J. Bacteriol.**, v. 143, p. 1480- 1490, 1980.

PATEL, J. B. 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. **Mol. Diagn.**, v. 6, 313–321, 2001.

PEREIRA, P. A. A.; ARAUJO, R. S.; ROCHA, R. E. M.; STEINMETZ, S. Capacidade dos genótipos de feijoeiro de @xar N₂ atmosférico. **Pes. Agro. Bra.** v. 19, p. 811-815, 1984.

PERRET, X.; STAEHELIN, C.; BROUGHTON, W. Molecular basis of symbiotic promiscuity. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 64, p. 180–201. 2000.

PETTI, C. A. Detection and identification of microorganisms by gene amplification and sequencing. **Clin. Infect. Dis.**, v. 44, p. 1108–1114, 2007.

PHILIPPOT, L.; RAAIJMAKERS, J. M.; LEMANCEAU, P.; VAN DER PUTTEN W. H. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. **Nature Rev. Microbiol.**, v. 11, p. 789–799, 2013.

POPP, C.; OTT, T. Regulation of signal transduction and bacterial infection during root nodule symbiosis. **Curr. Opin. Plant Biol.**, v. 14, p. 458–467, 2011.

RAKASH, N.; RANA, K. Food legumes for livelihood and nutritional security in North Eastern Himalayan region: Prospects and constraints. **Indian Journal of Agricultural Sciences**. v. 83, p. 899-906, 2013.

RAMOS, P. L.; MOREIRA-FILHO, C. A.; TRAPPEN, S.; SWINGS, J.; VOS, P.; BARBOSA, H. R.; An MLSA-based online scheme for the rapid identification of *Stenotrophomonas* isolates. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 4; p. 394-399.

RASCOVAN, N.; CARBONETTO, B.; PERRIG, D.; DÍAZ, M.; CANCIANI, W.; ABALO, M. Integrated analysis of root microbiomes of soybean and wheat from agricultural fields. **Sci. Rep.**, v. 6, p. 28084, 2016.

RELLER, L. B.; WEINSTEIN, M. P.; PETTI, C. A. Detection and Identification of Microorganisms by Gene Amplification and Sequencing. **Clin. Inf. Dis.**, v. 44, n. 8, p. 1108–1114, 2007.

RIBEIRO, R. A.; ORMENO-ORRILLO, E.; DALL'AGNOL, R. F.; GRAHAM, P. H.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; HUNGRIA, M. Novel *Rhizobium* lineages isolated from root nodules of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Andean and Mesoamerican areas. **Res. Microbiol.**, v. 164, p. 740–748, 2013.

RIVAS, R.; GARCÍA-FRAILE, P.; VELÁZQUEZ, E. Taxonomy of bacteria nodulating legumes. **Microbiology Insights**, v. 2, p. 51-69, 2009.

ROSAS, C.; CASTRO, A.; ROBLETO, E. A. A method for screening *Phaseolus vulgaris* L. germplasm for preferential nodulation with a selected *Rhizobium etli* strain. **Plant and Soil**, v. 203, p. 71-78, 1998.

SCHLATTER, D.; KINKEL, L.; THOMASHOW, L.; WELLER, D.; PAULITZ, T. Disease suppressive soils: new insights from the soil microbiome. **Phytopathol.**, v. 107, p. 1284–1297, 2017.

SLATTERY, J. J.; COVENTRY, D. R.; SLATTERY, W. Rhizobial ecology as affected by the soil environment. **Aust. J. Exp. Agr.**, v. 41, p. 289–298, 2001.

STACKEBRANDT, E.; FREDERIKSEN, W.; GARRITY, G. M.; GRIMONT, P. A.; KAMPFER, P., MAIDEN, M. C. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. **Int. J. of Sys. and Ev. Mic.**, v. 52, p.1043-1047, 2002.

THUNG, M. **Common beans**: research for crop improvement. Wallingford: 1991, p.737-834.

VANDAMME, P.; POT, B.; GILLIS, M.; DEVOS, P.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiological Reviews**, v. 60, n. 2, p. 407-438, 1996.

VASSE, J.; DE BILLY, F.; CAMUT, S.; TRUCHET, G. Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen fixation in alfalfa nodules. **J. Bacteriol.**, v. 172, p. 4295-4306, 1990.

VERÁSTEGUI-VALDÉS, M. M.; ZHANG, Y. J.; RIVERA-ORDUÑA, F. N.; CHENG, H. P.; SUI, X. H.; WANG, E. T. Microsymbionts of *Phaseolus vulgaris* in acid and alkaline soils of Mexico. **Sys. and App. Mic.**, v. 37, n. 8, p. 605-12. 2014.

4.0 Artigo

Influence of soil on the bacterial community associated with common bean roots (*Phaseolus vulgaris* L.)

Mendes, B. O.¹; Rodrigues, E. P.²

1 Universidade Estadual de Londrina – bruno.oliveira69@hotmail.com

2 Universidade Estadual de Londrina – bioliza@gmail.com

Artigo a ser submetido para a revista *Applied Soil Ecology*

RESUMO

A microbiota é diretamente influenciada pela composição química e física do solo. A caracterização dessa diversidade em solos de ambientes inexplorados, tais como os de reservas naturais é de suma importância na descoberta de novas bactérias de interesse biotecnológico que podem beneficiar a associação entre feijão-bactéria. Assim, o presente estudo teve como objetivo caracterizar a diversidade de bactérias associativas às raízes de *P. vulgaris*, além de avaliar a influência do solo nesta comunidade. Para isso, os feijões foram cultivados em casa de vegetação utilizando vasos de Leonard. Após 30 dias, as raízes foram coletadas e maceradas em solução salina 0,85% e a suspensão obtida foi diluída, plaqueada e colônias distintas foram selecionadas para a realização desse estudo. Os isolados recuperados foram identificados pela amplificação, sequenciamento e análise do gene 16S RNAr. No total, foram obtidos 77 isolados, no qual 30 pertenceram ao solo de Ortigueira, 33 de Ponta Grossa e 14 de Londrina. A comunidade bacteriana em raízes de feijão foi composta por 20 gêneros distintos, incluindo *Enterobacter*, *Rhizobium*, *Paraburkholderia*, *Burkholderia*, *Kosakonia*, *Herbaspirillum*, *Ralstonia*, *Citrobacter*, *Pantoea*, *Raoultella*, *Bacillus*, *Stenotrophomonas*, *Comamonas*, *Cupriavidus*, *Curtobacterium*, *Methylovirgula*, *Pseudomonas*, *Cellulomonas*, *Aquitalea* e *Staphylococcus*. Os gêneros predominantes foram *Enterobacter* e *Paraburkholderia*, os quais foram encontrados nos solos de Ortigueira e Ponta Grossa, respectivamente. A análise química e física dos solos revelou uma composição argilosa e com uma alta taxa de alumínio em Ortigueira, revelando que *Enterobacter* possui flexibilidade perante a essas características do solo. Já o solo de Ponta Grossa apresentou uma fertilidade pobre e uma acidez elevada, o que viabilizou a presença de *Paraburkholderia*, a qual possui tolerância a acidez. Conclui-se que há uma diversidade de bactérias em relação a cada solo, influenciado pela característica e composição do solo, pois nenhum conjunto exclusivo de bactérias foi encontrado nos três tipos de solos avaliados.

Palavras-chave: bactérias associativas, feijão, diversidade, solo.

1.0 Introdução

O solo é habitado por uma grande diversidade de bactérias que utilizam diversas substâncias encontradas no mesmo, tais como fontes de carbono e nitrogênio. Algumas espécies são capazes de se associarem com as plantas, colonizando sua superfície e tecidos internos das raízes sem causar sintomas de doenças. As bactérias associativas beneficiam as plantas auxiliando o crescimento, desenvolvimento e saúde da mesma por diferentes mecanismos e processos (XIA et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2003). Essa simbiose proporciona benefícios tanto para as espécies de microrganismos quanto para as espécies de plantas que estão ali envolvidas (BUSBY et al., 2017).

No estabelecimento da interação entre a planta e a bactéria, bactérias presentes no solo são recrutadas por meio da exsudação radicular de compostos orgânicos como açúcares, ácidos orgânicos, aminoácidos e polissacarídeos. Os exsudatos radiculares atraem as bactérias para a rizosfera (região adjacente às raízes e sob influência destas) criando uma condição favorável para essas bactérias colonizarem esta região e a superfície das raízes, o rizoplano. Algumas espécies conseguem se estabelecer no interior dos tecidos das raízes e demais órgãos das plantas e são conhecidas como bactérias endofíticas (NAVEED et al, 2017).

Em espécies de plantas leguminosas, em particular, as bactérias simbióticas (rizóbios) induzem a formação de nódulos radiculares e realizam a fixação biológica do nitrogênio (FBN) fornecendo à planta hospedeira, o N na forma de amônia. Além dos rizóbios, as raízes e nódulos de plantas leguminosas hospedam uma grande diversidade de bactérias endofíticas e associativas que desempenham diversas

atividades capazes de promover o crescimento e proteção das plantas (STACEY, 2007).

Devido à importância destas bactérias, a microbiota das plantas, principalmente aquelas de interesse agrícola, tem sido alvo de diversos estudos que mostram uma grande diversidade de bactérias associadas às plantas. Em plantas leguminosas, estão presentes mais de 12 gêneros de α -Proteobacteria e 2 gêneros de β -Proteobacteria (PEIX, et al., 2015).

Dentre as bactérias que se estabelecem nos nódulos, auxiliando na fixação do nitrogênio, pode-se destacar os gêneros *Dyella*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* e *Steroidobacter*, enquanto nas regiões das raízes destacam-se os gêneros *Paenibacillus*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Ensifer*, *Agrobacterium*, *Blastobacter*, *Dyadobacter* e *Chitinophaga* (BUSBY et al., 2016; PANDYA et al., 2013; ZAHRAN, 2017). As bactérias pertencentes ao gênero *Dyella*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* e *Steroidobacter* foram encontradas em nódulos de *Lespedeza* spp, enquanto os gêneros *Paenibacillus*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Ensifer*, *Agrobacterium*, *Blastobacter*, *Dyadobacter* e *Chitinophaga* foram encontradas em nódulos de *Vigna* spp. Algumas destas espécies, assim como *Paenibacillus*, *Enterobacter* e *Agrobacterium* possuem grande importância biotecnológica e têm sido utilizadas como biofertilizantes, aumentando o crescimento, rendimento vegetal e mantendo a fertilidade do solo (MORA et al., 2014; PEIX, et al., 2015).

Entre as leguminosas que têm sido estudadas destacam-se a soja e o feijão, duas culturas agrícolas de grande importância econômica e social no cenário brasileiro. O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) possui uma forte presença na alimentação humana como fonte de proteína, sendo o Brasil o terceiro maior

produtor e consumidor mundial (CONAB, 2018). No entanto, a sua produtividade é afetada por pragas, doenças e deficiência nutricional, as quais aliam-se com a sua baixa absorção de nitrogênio proveniente de fertilizantes químicos. Além desses fatores, é importante destacar que o alto custo de insumos externos de qualidade afeta diretamente os pequenos produtores (KAWAKA et al., 2018; OECD, 2016; ROSAS et al., 1998).

De modo geral, a simbiose entre leguminosas e rizóbios apresenta especificidade entre ambos, como ocorre entre a soja e *Bradyrhizobium* (SINSUWONGWAT et al., 2002), *Vigna radiata* e *Ensifer* (ZHANG et al., 2008) e *Mimosa diplotricha* e *Burkholderia* (BONTEMPS et al., 2016). Uma característica marcante do feijão é a sua promiscuidade nas associações simbióticas, estas que resultam em uma grande diversidade de bactérias simbiotes associadas ao mesmo (MICHIELS et al., 1998; HUNGRIA et al., 2000; 2003). Dentre as bactérias que são capazes de nodular o feijão, destacam-se os gêneros *Rhizobium*, *Ensifer*, *Bradyrhizobium* (VERÁSTEGUI-VALDÉS et al., 2014) e *Paraburkholderia* (DALL'AGNOL et al., 2018). Entre as bactérias que estabelecem associação com feijão, tem sido descrita espécies de *Azotobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Serratia* e *Azospirillum* (LAJUDIE et al., 1998).

Essa microbiota presente no solo é diretamente afetada por suas propriedades, tais como pH, textura do solo, matéria orgânica e material original. O material original fornece desenvolvimento para a comunidade microbiana por meio da formação do solo enquanto a matéria orgânica fornecerá energia para essas comunidades, modelando assim a composição destas juntamente com o pH. Já a textura do solo influenciará no estado dos nutrientes, afetando a atividade metabólica dos microrganismos (ZHONG et al., 2010; LOMBARD et al., 2011; XUN

et al., 2015). Além desses, um outro fator importante que afeta diretamente a microbiota da planta é o seu estágio de desenvolvimento, no qual diferentes comunidades bacterianas estarão associadas em diferentes estágios de desenvolvimento (CHAPARRO et al., 2013). Também é relatado que o genótipo da planta também é um fator que influencia na presença de diferentes comunidades bacterianas, além dos tipos de exsudatos que cada planta secreta, resultando assim em uma relação mais específica entre planta-bactéria (BULGARELLI et al., 2015).

O solo apresenta uma grande diversidade de bactérias, sendo a principal fonte de bactérias associativas, endofíticas e simbióticas. Assim, o solo é considerado um importante reservatório de bactérias que possuem um potencial na promoção do crescimento das plantas, incluindo feijoeiro. As bactérias capazes de se associarem as raízes de feijão podem beneficiar a saúde e crescimento deste, além de serem promissoras no desenvolvimento de ações biotecnológicas a fim de melhorar a qualidade e produtividade desta cultura com sustentabilidade. A caracterização da diversidade bacteriana em solos de ambientes inexplorados, tais como os de reservas naturais é de suma importância na descoberta de novas bactérias de interesse biotecnológico que podem favorecer benefícios na associação Feijão-*Rhizobium*. Considerando a grande importância da cultura do feijão no cenário brasileiro, este trabalho tem como objetivo caracterizar a diversidade de bactérias associativas de raízes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris L.*) e avaliar a influência do solo nesta comunidade.

2.0 Material e métodos

2.1 Coleta do Solo

Os solos coletados foram provenientes de reservas naturais no estado do Paraná (Tabela 1). As coletas foram autorizadas pelo Instituto Ambiental do Paraná (IAP).

Foram agrupadas 20 amostras simples de cada solo, formando-se uma amostra composta contendo aproximadamente 10 Kg de solo de cada região. Para isso, foi estabelecida uma área no local de coleta, a qual teve a sua superfície limpa com o auxílio de uma enxada. Posteriormente as amostras foram coletadas a aproximadamente 10 metros de distância umas das outras em sentido *zig-zag* e a uma profundidade de 10-20 cm utilizando-se uma pá de jardinagem. O armazenamento foi realizado em sacos de *zip-lock* e colocados em coolers com bolsas de gelo. Todos os materiais utilizados foram desinfestados entre uma região de coleta a outra (CARTER; GREGORICH, 2006; FEILIZOLA et al., 2006).

Tabela 1. Localidades dos solos de reservas naturais no estado do Paraná

Município	Classificação do solo	Localização	Vegetação característica
Ortigueira-PR	Argissolo Amarelo Arenoso	Morro do Mulato 23°57'58"S 51°05'17"O	Rasteira e uma floresta estacional semidecidual.
Pronta Grossa- PR	Nitossolo Litólico Arenoso	Dolinas Gêmeas 25°08'34"S 49°57'24"O	Rasteira, sendo coberta em grande parte por arbustos e herbáceas.
Londrina- PR	Latossolo Vermelho Argiloso	Universidade Estadual de Londrina, no Horto Florestal 23°19'39"S 51°12'23"O	Vegetação remanescente de floresta estacional semidecidual.

2.2 Análise química e física do solo

As análises das amostras de solo foram realizadas no Laboratório de Solos da UEL. Dentre as variáveis químicas examinadas destacam-se o pH, acidez potencial, potássio, cálcio, magnésio, alumínio, fósforo e carbono orgânico. Dentre

as variáveis físicas destacam-se o percentual de argila, silte e areia. Ambas análises seguiram a metodologia de Pavan et al. (1992).

2.3 Condução do experimento utilizando feijoeiro como planta-isca (trapping)

As bactérias foram obtidas de raízes de feijão comum pela metodologia de planta-isca. As plantas foram cultivadas em vasos de "Leonard" contendo uma mistura de areia e vermiculita (1:1 v/v) esterilizada. Foi adicionado 100 g de solo fresco (30%) a esta mistura (HOWIESON; DILWORTH, 2016).

Foram utilizados 12 vasos para cada solo, no qual cada vaso recebeu o plantio de duas sementes de feijão. Sete dias após o plantio foi feito o desbaste, mantendo apenas uma planta/vaso. As plantas foram cultivadas em solução nutritiva livre de nitrogênio (BROUGHTON; DILWORTH, 1971). Foram utilizadas quatro soluções estoque (Anexo 1), destes estoques foram utilizados 0,5 mL e diluídos em 1 L de água destilada para a preparação da solução nutritiva.

Após 30 dias de cultivo em casa de vegetação, as raízes das 12 plantas foram coletadas e reunidas em 3 amostras compostas (4 raízes/amostra) constituindo assim, três repetições por solo.

2.4 Isolamento bacteriano

Para fins de isolamento, as raízes foram lavadas em água corrente para retirada do substrato e, em seguida, em salina a 0,85% por 3 vezes. Posteriormente, amostras de 5 g de raízes foram pesadas e, em seguida, maceradas em 45 mL de solução salina com o auxílio de um cadinho e pistilo. Após a maceração foram retirados 1 mL da suspensão para a realização da diluição seriada até 10^{-6} . Em seguida, Amostras de 100 μ L das diluições 10^{-4} a 10^{-6} foram plaqueadas com o

auxílio de uma alça de Drigalski nos meios de cultivo YCED (CRAWFORD, 1993) e YMA (Vincent, 1970). Após o plaqueamento, as placas foram incubadas a 28°C por um período de 3 dias. As colônias morfológicamente distintas foram repicadas em meio YMA e TSA para purificação dos isolados. As bactérias foram armazenadas a -20° C em TSB (*Tryptic Soy Broth* KASVI®) contendo glicerol Synth® 25%.

2.5 Caracterização molecular

2.5.1 Extração de DNA

O DNA foi obtido de culturas crescidas em meio TSB após 3 dias de crescimento. A cultura (2 mL) foi centrifugada a 12.000 *rpm* por 10 minutos e o material obtido foi lavado em água destilada autoclavada e transferido para um tubo de 2 mL com pérolas de vidro (0,5-1,0 mm). Após centrifugação (12.000 rpm por 5 minutos), o sobrenadante foi descartado e o material foi homogeneizado por 5 minutos em vórtex com 200 µL de tampão de lise (Triton 2%; SDS 1%; NaCl 100 mM; Tris HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM pH 8,0) e 200 µL de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1). Posteriormente, o lisado celular foi homogeneizado com 200 µL de tampão TE (Tris 10mM – EDTA 1mM) (pH 8,0) e centrifugado por 5 minutos (12.000 *rpm*, a 4°C). A fase aquosa resultante foi transferida para outro microtubo e o DNA foi lavado (2x) com clorofórmio-álcool isoamílico (24:1). Ao final, a fase aquosa foi transferida para um novo microtubo e o DNA foi precipitado com etanol absoluto gelado, com incubação *overnight* a -20°C. O DNA precipitado foi recuperado por centrifugação (12.000 *rpm*, 10 minutos, 4°C), seco em temperatura ambiente e em seguida, ressuspendido em 50 µL de tampão TE 10:1. O DNA foi armazenado a -20°C (AUSUBEL et al., 2003).

A qualidade e a concentração do DNA foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão TBE 0,5x (0,04 M Tris-borato/0,001 M EDTA) e foi

utilizado o *Lambda* DNA como marcador molecular. Os géis foram corados com brometo de etídeo (0,5 µg/mL), visualizados em transiluminador sob luz ultravioleta e fotografados em sistema digital de fotodocumentação (L-Pix EX Loccus).

2.5.2 Amplificação do gene 16S rRNA dos isolados

A amplificação do gene RNA ribossomal 16S foi feita por meio de uma reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando os primers (Invitrogen®) 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1492r (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (LANE et al., 1985), homólogos a regiões conservadas do gene 16S RNA ribossomal de bactérias (aprox. 1500 pb). As reações de amplificação foram feitas em 25 µL contendo 10-20 ng de DNA, 12,5 µL de GoTaq® Green Master Mix 2x (Promega), 5 pmol de cada primer (marca) e água ultrapura q.s.p. A amplificação foi realizada em um termociclador com uma desnaturação inicial de 94°C durante 5 min, seguidos por 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, temperatura de pareamento a 55°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 1 minuto e uma extensão final a 72°C por 5 minutos. Os produtos da PCR foram analisados por meio de eletroforese em gel de agarose 1%, corados com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) e após, foram visualizados com o auxílio de um transluminador e fotografados em sistema digital de fotodocumentação (L-Pix EX Loccus). Foram avaliados os padrões de banda e a massa molecular referente a cada padrão observado.

2.5.3 Purificação e sequenciamento

Os produtos da PCR foram purificados com 1 volume de acetato de amônia (Anidrol®) 7,5 M e 3 volumes de etanol absoluto (Anidrol®) a temperatura ambiente por 15 minutos. Após a centrifugação por 15 minutos a 12.000 rpm, o sobrenadante foi descartado e o material foi lavado duas vezes com etanol (Anidrol®) 70%. Após secagem a 37° C por 1 hora, o material foi ressuscitado em 20 µL de água

ultrapura (Mili-Q[®]) (SAMBROOK, 2001). A concentração do DNA foi quantificada em gel de agarose 1% utilizando o marcador molecular *Low mass DNA Ladder* (Invitrogen[®]) para posterior sequenciamento.

As reações de sequenciamento foram realizadas em um sequenciador automático ABI 3500XL (Applied Biosystem[®]) utilizando o kit de reação de sequenciamento *ABI Prism BigDye Terminator Cycle sequencing Read Reaction*, empregando-se o primer *27f* que foi utilizado na amplificação por PCR. A concentração de DNA utilizada foi de 20 ng, conforme as recomendações do fabricante.

2.6 Análise dos dados

As sequências parciais do gene 16S RNAr obtidas de cada isolado foram editadas inicialmente no *software* BioEdit v.7, onde as sequências foram limpas e retirados os *gaps* e bases divergentes e, em seguida, comparadas com as sequências de bactérias representantes encontradas nas bases de dados do *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e do *Ribosomal Database Project* (RDP) (<http://rdp.cme.msu.edu/>). A sequência do gene 16S RNAr de cada isolado foi alinhada à sequências de estirpes tipo representativas no programa Mega X para as análises filogenéticas dos isolados. Todas as sequências parciais do gene 16S RNAr determinadas neste estudo foram submetidas no *GenBank* (Anexo 2)

3.0 Resultados

3.1 Caracterização dos solos

Os solos utilizados nos experimentos representam condições edafoclimáticas distintas como revelado nas análises físico-química. As regiões de coleta não apresentam histórico de uso agrícola do solo e possuem cobertura vegetal nativa.

O solo de Londrina coletado no horto florestal da Universidade Estadual de Londrina (UEL) possui uma cobertura vegetal de fragmento de floresta e relevo suave. É classificado como Latossolo Vermelho de textura muito argilosa com teor maior que 71% (Tabela 2) de argila, característico da região de Londrina. Entre os três tipos de solo utilizados, foi o solo que apresentou maior teor de matéria orgânica (44,37 g/Kg) e carbono orgânico (25 g/Kg), contribuindo para a elevada fertilidade deste solo e para a elevada quantidade de nitrogênio do solo (2,95 g/Kg) (Tabela 3).

Tabela 2. *Análise física dos solos de reservas naturais do Paraná.*

Localidade	Argila (%)	Silte (%)	Areia (%)
Londrina	71,70	14,71	13,59
Ponta Grossa	14,53	1,97	83,50
Ortigueira	43,02	7,50	49,48

O solo de Ortigueira foi coletado em uma área de preservação (RPPN Serra do Cadeado) em local conhecido como Morro do Mulato. A região representa uma área de transição de campo e floresta de relevo forte montanhoso. O solo é classificado como Argissolo Amarelo de textura argilosa com 43% de argila e 49%

de areia. É um solo de baixa fertilidade com baixo teor de matéria orgânica (13 g/Kg) e nitrogênio (0,86 g/kg).

O solo de Ponta Grossa foi coletado na reserva natural de Campos Gerais na região conhecida como Dolinas Gêmeas em uma região com relevo montanhoso com afloramentos rochosos e cobertura vegetal típica de campo. É classificado como Nitossolo Litólico de textura arenosa com 83% de areia 14% de argila. Apresentou elevada acidez, e baixo teor de matéria orgânica (22,61 g/Kg) e nitrogênio (0,88 g/kg) contribuindo para a baixa fertilidade deste solo.

Os resultados obtidos a partir da análise química e física dos solos de Ortigueira, Ponta Grossa e Londrina apresentam-se na Tabela 2 e 3.

Tabela 3. Análise química dos solos de reservas naturais do Paraná

Variáveis Analisadas	Ponta Grossa	Ortigueira	Londrina
pH (H ₂ O)	4,92	5,01	5,23
pH (CaCl ₂)	3,86	3,93	4,82
Acidez Potencial (H+Al) (cmolc/dm ³)	7,76	9,23	8,16
Potássio (cmolc/dm ³)	0,08	0,06	0,40
Cálcio (cmolc/dm ³)	0,80	1,11	6,27
Magnésio (cmolc/dm ³)	0,25	0,51	0,97
Alumínio (cmolc/dm ³)	1,08	1,48	0,21
Fósforo (mg/dm ³ = kg)	2,83	1,32	2,12
Nitrogênio (g/kg ⁻¹)	0,88	0,86	2,95
Matéria orgânica (g/kg ⁻¹)	22,21	22,61	44,37
Carbono Orgânico (g/dm ⁻³)	12,88	13,11	25,74

3.2 Isolamento de bactérias de raízes de feijoeiro

Por meio da técnica de planta-isca, visando o isolamento de bactérias das raízes de feijão, foi possível recuperar 77 isolados no total, sendo 45 isolados do meio YMA e

32 do YCED. Deste total, 30 isolados pertenceram ao solo proveniente de Ortigueira, 33 do solo de Ponta Grossa e 14 isolados do solo de Londrina (Tabela 4).

Tabela 4. Quantidade de isolados obtidos de cada meio de cultura

Localidade	Meio YCED	Meio YMA	Total
Ortigueira	14	16	30
Ponta Grossa	13	20	33
Londrina	5	9	14
Total	32	45	77

3.3 Sequenciamento parcial do gene 16S RNAr

Para identificação molecular dos isolados, o gene 16S RNAr dos 77 isolados (Tabela 4) foram amplificados e sequenciados. Todas as sequências (\cong 900 pb) apresentaram similaridade igual ou superior a 98% em relação às sequências das suas respectivas espécies semelhantes. Posteriormente, as sequências obtidas foram submetidas ao GenBank do NCBI, seguindo instruções da própria plataforma, e obteve-se seu número de acesso próprio para cada sequência (Anexo 2).

Após a comparação das sequências no banco de dados RDP os isolados foram identificados como representantes de três filos, Firmicutes (3), Actinobacteria (2) e Proteobacteria (72). Dentro do filo Proteobacteria foram encontrados representantes das classes α -Proteobacteria (3), β -Proteobacteria (25) e γ -Proteobacteria (44), sendo esses filos os predominantes na comunidade bacteriana das raízes de feijão.

Os isolados foram classificados em 20 gêneros distintos, no qual *Enterobacter* foi o gênero de maior representatividade com 29 isolados, seguido de *Paraburkholderia* (9), *Herbaspirillum* (7), *Ralstonia* (5), *Pantoea* (3), *Raoultella* (3),

Kosakonia (3) e *Pseudomonas* (3). Os gêneros *Rhizobium*, *Bacillus* e *Stenotrophomonas* tiveram dois isolados cada e nove gêneros tiveram apenas um isolado cada, sendo esses *Burkholderia*, *Comamonas*, *Cupriavidus*, *Curtobacterium*, *Methylovirgula*, *Citrobacter*, *Cellulomonas*, *Aquitalea* e *Staphylococcus* (Tabela 5).

Tabela 5. Gêneros de bactérias obtidos de raízes de *P. vulgaris* obtidos dos solos de reservas naturais do Paraná.

Gêneros	Londrina	Ponta Grossa	Ortigueira	Total
<i>Cellulomonas sp.</i>	1	-	-	1
<i>Curtobacterium sp.</i>	-	-	1	1
<i>Bacillus sp.</i>	-	-	2	2
<i>Staphylococcus sp.</i>	1	-	-	1
<i>Methylovirgula sp.</i>	-	1	-	1
<i>Rhizobium sp.</i>	-	2	-	2
<i>Burkholderia sp.</i>	-	1	-	1
<i>Cupriavidus sp.</i>	1	-	-	1
<i>Herbaspirillum sp.</i>	-	5	2	7
<i>Paraburkholderia sp.</i>	2	7	-	9
<i>Ralstonia sp.</i>	-	2	3	5
<i>Comamonas sp.</i>	-	1	-	1
<i>Aquitalea sp.</i>	-	-	1	1
<i>Citrobacter sp.</i>	-	1	-	1
<i>Enterobacter sp.</i>	3	8	18	29
<i>Kosakonia sp.</i>	-	-	3	3
<i>Pantoea sp.</i>	3	-	-	3

<i>Pseudomonas sp.</i>	2	1	-	3
<i>Raoultella sp.</i>	-	3	-	3
<i>Stenotrophomonas sp.</i>	1	1	-	2
Total	14	33	30	77

A distribuição dos gêneros encontrados nas amostras de solos de diferentes localidades não foi homogênea, sendo observado alguns gêneros exclusivos de cada localidade, sendo esses *Bacillus sp.*, *Rhizobium sp.* e *Pantoea sp.* (Tabela 5), enquanto outros foram comuns em amostras de duas localidades como *Herbaspirillum sp.* (Ponta Grossa e Ortigueira) e *Paraburkholderia sp.* (Londrina e Ponta Grossa). O gênero *Enterobacter* foi o único de ocorrência comum nos três solos; contudo, foi obtido predominantemente do solo de Ortigueira (Tabela 5).

Representantes do gênero *Enterobacter sp.* (29) apresentaram similaridade com as espécies *E. cloacae*, *E. kobei* e *E. asburiae*, sendo esta última a espécie de maior predominância nas diferentes amostras (Tabela 6). O gênero *Paraburkholderia sp.* foi representado pelas espécies *P. mimosarum*, *P. difusa* e *P. nodosa*, sendo a primeira espécie com o maior número de isolados (6), sendo todos provenientes de amostras de Ponta Grossa. O gênero *Herbaspirillum sp.*, foi o terceiro mais comum nas amostras de feijão (7), apresentou similaridade com a espécie *H. huttiense* e foram todas obtidas de amostras de Ponta Grossa (Tabela 6). Apenas dois isolados foram identificados como representantes do gênero *Rhizobium sp.*, simbiote de feijoeiro, sendo ambos das amostras de Ponta Grossa e com maior similaridade as espécies *R. pisi* e *R. phaseoli*.

Tabela 6. Identificação dos isolados de bactérias obtidos de raízes de *P. vulgaris* obtidos dos solos de reservas naturais do Estado do Paraná.

Grupo taxonômico	Espécie mais próxima	Isolados
Actinobacteria; Cellulomonadaceae	<i>Cellulomonas pakistanensis</i>	U14
Actinobacteria; Microbacteriaceae	<i>Curtobacterium citreum</i>	O28
Firmicutes; Bacillaceae	<i>Bacillus tequilensis</i>	O19, O26
Firmicutes; Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	U8
α -Proteobacteria; Methylocystaceae	<i>Methylovirgula ligni</i>	P6
α -Proteobacteria; Rhizobiaceae	<i>Rhizobium pisi</i>	P4
	<i>Rhizobium phaseoli</i>	P7
β -Proteobacteria; Burkholdericeae	<i>Burkholderia arboris</i>	P10
	<i>Cupriavidus metallidurans</i>	U11
	<i>Paraburkholderia diffusa</i>	U9, U1
	<i>Paraburkholderia mimosarum</i>	P3, P5, P13, P14, P20, P27
	<i>Paraburkholderia nodosa</i>	P26
	<i>Ralstonia insidiosa</i>	P9
	<i>Ralstonia pickettii</i>	O1, O25, O29 P1
β -Proteobacteria; Oxalobacteraceae	<i>Herbaspirillum huttiense</i>	O4, O14 P2, P17, P19, P22, P24

β -Proteobacteria; Comamonadaceae	<i>Comamonas testosteroni</i>	P18
β -Proteobacteria; Chromobacteriaceae	<i>Aquitalea denitrificans</i>	O27
	<i>Citrobacter youngae</i>	P23
	<i>Enterobacter asburiae</i>	U3, U5, U13, O3, O6, O7, O8, O9, O10, O11, O13, O20, O21, O22, O23, O30, P8, P11, P12, P16, P25, P29, P30, P32
γ -Proteobacteria Enterobacteriaceae	<i>Enterobacter cloacae</i>	O12, O15, O16, O17
	<i>Enterobacter kobei</i>	O5
	<i>Kosakonia oryzae</i>	O2, O24
	<i>Kosakonia radicincitans</i>	O18
	<i>Raoultella planticola</i>	P21, P28 e P33
γ -Proteobacteria: Erwiniaceae	<i>Pantoea allii</i>	U7, U10
	<i>Pantoea anthophila</i>	U6
Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas monteilii</i>	U12, P15
	<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	U2
γ -Proteobacteria; Xanthomonadaceae	<i>Stenotrophomonas pavanii</i>	U4 P31

4.0 Discussão

A associação de bactérias em leguminosas é caracterizada pela formação de nódulos radiculares, os quais são formados de maneira específica. Dentre as classes de bactérias que nodulam o feijão, destaca-se a α -Proteobacteria, que abrangem os gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Ensifer*, *Mesorhizobium*, *Azorhizobium* e *Allorhizobium* (WILLEMS, 2006) e β -Proteobacteria, no qual os principais gêneros são *Burkholderia*, *Cupriavidus* e *Ralstonia* (GYANESHWAR et al., 2011).

Em relação a presença de α -Proteobacteria associativas, inúmeros estudos revelam sua predominância em leguminosas (DE MEYER et al., 2015; TAK; GEHLOT, 2019; TORRES, 2009; LYRA et al., 2019; RAJNOVIC et al., 2019). Nesses estudos foi possível observar uma frequente presença do gênero *Rhizobium*, especificamente presente em nódulos, sendo esse o mais comum na associação em leguminosas. Isolados pertencentes a classe das β -Proteobacteria, tais como *Burkholderia* e *Cupriavidus* também tem sido associado a nódulos radiculares de feijão (BERRET; PARKER, 2006).

Assim como no feijão, outros estudos também relatam a presença de bactérias não específicas em leguminosas como *Mimosa* sp. (DALL'AGNOL et al., 2016; PIRES et al., 2017). No entanto, esses mesmos estudos observaram que as bactérias mais prevalentes pertenciam as classes das α -Proteobacteria e β -Proteobacteria, diferentemente do que foi encontrado em nosso estudo, no qual a classe mais prevalente foi γ -Proteobacteria, seguido de β -Proteobacteria.

Dos três tipos de solos analisados em nosso estudo, o de Ponta Grossa foi o que apresentou a maior frequência de β -Proteobacteria, o que pode ser justificado

pela característica do mesmo, possuindo fertilidade pobre e alta acidez, assim como relatado por Dall'agnol et al. (2016).

Assim, pode-se observar que o solo e a sua respectiva composição pode afetar diretamente a presença das comunidades bacterianas, assim como o pH (FIERER; JACKSON, 2006; LAUBER et al., 2008), vegetação (WEINERT et al., 2011), textura do solo (SCHUTTER et al., 2001) e composição do solo (HANSEL et al., 2008; WU et al., 2008). Outro fator importante que influencia a comunidade de bactérias que se associam às raízes é o genótipo da planta, no qual o seu estágio de desenvolvimento e até mesmo o tipo de cultivar podem afetar no recrutamento de bactérias presentes na rizosfera (UREN, 2000; NARASIMHAN et al., 2003; BAIS et al., 2006; BADRI; VIVANCO, 2009).

Nossos resultados evidenciaram que o feijão cultivado em três solos distintos apresentou comunidades bacterianas distintas em suas raízes, ressaltando que o solo foi um fator determinante na composição da comunidade bacteriana. Não foi observado um conjunto comum de bactérias nas três condições de solo, com exceção do gênero *Enterobacter* sp. que foi encontrado nos três tipos de solos avaliados. Embora alguns gêneros tenham sido observados em mais de uma condição de cultivo, as comunidades foram distintas e apresentaram pouca relação entre si. Alguns estudos apresentaram semelhanças em solos distintos, porém não identificaram uma alta prevalência de *Enterobacter* nestes solos (ROESCH et al., 2007; ELSHAHED et al., 2008; QUIRINO et al., 2009). No entanto, outros autores ressaltaram que mesmo *Enterobacter* estando presente no solo, a predominância ainda é de α -Proteobacteria (MADIGAN; MARTINKO, 2005; BRUCE et al, 2010)

Estudos similares (BOOWE et al., 1998; KUZUYAKOV et al., 2015; MOMMER et al., 2016) relataram uma alteração em carboidratos e aminoácidos liberados na exsudação, a qual fez com que a diversidade de bactérias se modificasse, pois a nova estrutura e composição desses substratos trazia uma condição distinta de recrutamento em cada situação (BADRI et al., 2009; SHI et al., 2011). Seguindo esse fato e a característica marcante de cada solo pode-se afirmar que esses componentes trouxeram uma diversidade distinta devido a uma alteração nesses exsudatos, resultando em um recrutamento específico em cada um dos tipos de solo.

Um elemento que causa grande impacto e é considerado tóxico para diversos seres vivos é o alumínio. No entanto, esse pode ter mais efeitos negativos sobre as plantas do que nas bactérias (MACDONALD; MARTIN, 1988). O solo que apresentou o maior nível de alumínio foi o de Ortigueira (1,48), o que afetou diretamente na produção de nódulos das plantas presentes nesse solo. Sabe-se que o alumínio afeta diretamente no pH do solo, o que corrobora para a alta acidez potencial identificada no solo de Ortigueira (9,23) (Tabela 2). As bactérias que não possuem tolerância ao alumínio são pertencentes a ordem Rhizobiaceae, já as pertencentes a ordem Enterobacteriaceae possuem uma maior tolerância (WOOD et al., 1988; MORA et al., 2017), o que pode justificar a alta prevalência de *Enterobacter* encontrada em nosso estudo.

O gênero mais encontrado dentro das γ -Proteobacteria foi *Enterobacter* (29) (Tabela 4), que é uma rizobactéria promotora do crescimento vegetal (PGPR) e algumas espécies são utilizadas como fertilizantes (DI BENEDETTO et al., 2017). Dentre as espécies de *Enterobacter* mais encontradas em nosso estudo, destacam-se *E. asburiae* (24) e *E. cloaceae* (4). A espécie *E. cloaceae* é considerada um

complexo de espécies, que abrange *Enterobacter asburiae*, *E. cloacae*, *Enterobacter dissolvens*, *Enterobacter hormaechei*, *Enterobacter kobei*, *Enterobacter nimipressuralis*, e *Enterobacter cancerogenus*, no qual todos esses representantes são considerados patógenos oportunistas em humanos, apesar de promoverem o crescimento vegetal (BERG; HARTMANN, 2005). O gênero *Enterobacter* é considerado natural da microbiota do solo, além de se associar com o feijão como foi relatado em alguns estudos (TAGHAVI et al., 2010; KAYMAK, 2011; COSTA et al., 2012).

O segundo maior gênero encontrado foi *Paraburkholderia* (9), pertencente a classe β -Proteobacteria. Esse gênero é amplamente identificado no solo e possui tanto a capacidade de nodulação e auxílio na fixação do nitrogênio quanto a de associação às raízes e outras partes das plantas (BANIK et al., 2016; SESSITSCH et al., 2005). Atualmente o gênero está dividido em dois grupos, o grupo A abrange todas as *Burkholderia* que não são patogênicas para humanos e para plantas, representando um interesse biotecnológico (SPIKER et al., 2009), já o grupo B abriga as espécies patogênicas para as plantas e para os humanos (ESTRADA-DE LOS SANTOS et al., 2013). Devido a esse fato, muitas espécies do grupo A estão sendo reclassificadas como *Paraburkholderia* devido a esse interesse biotecnológico (KAUR, 2017). O solo de Ponta Grossa apresentou a maior prevalência de *Paraburkholderia* (7) (Tabela 4), essa que é frequentemente encontrada em solos mais ácidos (GARAU et al., 2009). Dentre as espécies de *Paraburkholderia*, a mais evidenciada em nosso estudo foi *P. mimosarum*, que até então é uma espécie comum em nódulos de *Mimosa* spp. (CHEN et al., 2006). Outra espécie encontrada nesse estudo que pertence ao grupo patogênico em humanos foi *Burkholderia arboris*, esta que pertence ao complexo de espécies *Burkholderia cepacia* que

abrange 17 espécies responsáveis pela fibrose cística (VANDAMME; DAWYNDT, 2011).

Ficou sem final!!!!

5.0 Conclusão

Conclui-se que uma alta diversidade de bactérias possuíram a capacidade de associação às raízes de *P. vulgaris*, exemplificada pelos 20 gêneros identificados nesse estudo. A característica e composição do solo foi um fator determinante nessa diversidade, pois nenhum conjunto exclusivo de bactérias foi encontrado nos três tipos de solos avaliados. No entanto, foi possível observar que o único gênero que possuiu a capacidade de associação às raízes de *P. vulgaris* nos três tipos de solo foi *Enterobacter*, evidenciando a flexibilidade desse gênero em solos distintos.

Nosso estudo também identificou *Paraburkholderia* no solo de Ponta Grossa, o que torna extremamente interessante, tendo em vista que esse solo apresentou fertilidade pobre e alta acidez. Assim, a utilização desse gênero em inoculantes comerciais pode trazer vantagens para a agroindústria devido a sua adaptação a condições mais extremas. Todo esse cenário evidencia a diversidade bacteriana que estes solos apresentam para candidatos a novos inoculantes.

Esse estudo permitiu que dois gêneros possam ser apontados como prováveis para ser utilizados na produção de inoculantes para feijão.

Um por estar presente em uma ampla gama de solos, com variação de pH, nutrientes, acidez, etc, e outro por estar bem adaptado a solos com condições extremas.

6.0 Referências Bibliográficas

- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K., 2003. *Current protocols in molecular biology*. New York, 4755.
- Badri, D. V., Weir, T. L., van der Lelie, D., Vivanco, J. M. 2009. Rhizosphere chemical dialogues: plant-microbe interactions. *Current Opinion in Biotechnology.*, 20, 642–650.
- Badri, D.V., and Vivanco, J.M., 2009. Regulation and function of root exudates. *Plant Cell Environ.*, 32, 666–681.
- Banik, A., Mukhopadhaya, S.K., Dangar, T.K., 2016. Characterization of n₂ -fixing plant growth promoting endophytic and epiphytic bacterial community of indian cultivated and wild rice (*Oryza Spp.*) Genotypes. *Planta.*, 243, 799–812.
- Barrett, C. F., Parker, M. A., 2006. Coexistence of burkholderia, cupriavidus, and rhizobium sp. Nodule bacteria on two *Mimosa Spp.* in Costa Rica. *Applied And Environmental Microbiology*, 72, 1198–1206.
- Berg, G., Eberl, L., Hartmann, A., 2005. The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. *Environ. Microbiol.*, 7, 1673–1685.
- Berrada, H., Nouioui, I., Houssaini, M., Ghachtouli, N., Gtari, M., Benbrahim, K., 2012. Phenotypic and genotypic characterizations of rhizobia isolated from root nodules of multiple legume species native of Fez, Morocco. *Afr. J. Microbiol. Res.*, 6, 5314–5324.
- Boakye, E. Y., Lawson, I. Y. D., Danso, S. K. A., Offei, S. K., 2016. Characterization and diversity of rhizobia nodulating selected tree legumes in ghana. *Symbiosis*, 69, 89–99.
- Bontemps, C., Rogel, M.A., Wiechmann, A., Mussabekova, A., Moody, S., Simon, M.F., Moulin, L., Elliott, G.N., Lacercat-Didier, L., Dasilva, C., 2016. Endemic mimosa species from Mexico prefer α -proteobacterial rhizobial symbionts. *New Phytol.*, 209, 319–333.
- Boone, R. D., Nadelhoffer, K. J., Canary, J. D. & Kaye, J. P., 1998. Roots exert a strong influence on the temperature sensitivity of soil respiration. *Nature*, 396, 570–572.
- Brady, C., Cleenwerck, I., Venter, S.N., Vancanneyt, M., Swings, J., Coutinho, T., 2008. Phylogeny and identification of pantoea species associated with plants, humans and the natural environment based on multilocus sequence analysis (MLSA). *Syst. Appl. Microbiol.*, 31, 447–460.
- BROUGHTON, W. J., DILWORTH, M. J., 1970. Methods in legume-rhizobium technology: plant nutrient solutions. In: SOMASEGARAN, P., HOBEN, H.J. (Ed.). *Handbook for Rhizobia*. Hawaii: NifTAL Project and University of Hawaii, 245–249.

- Bruce, T., Martinez, I.B., Maia Neto, O., 2010. Bacterial Community Diversity in the Brazilian Atlantic Forest Soils. *Microb Ecol* 60, 840–849.
- Busby, R. R., Rodriguez, G., Gebhart, D. L., Yannarell, A. C., 2016. Native *Lespedeza* species harbor greater non-rhizobial bacterial diversity in root nodules compared to the coexisting invader, *L. cuneata*. *Plant Soil*, 401, 427–436.
- Cardenas, L., Feijo, J. A., Kunkel, J. G., Sanchez, F., Holdaway-Clarke, T., Hepler, P. K., Quinto, C., 1999. Rhizobium nod factors induce increases in intracellular free calcium and extracellular calcium influxes in bean root hairs. *Plant Journal*, 19, 347–352.
- Carter, M. R., Grogorich, E. G. 2006. Soil sampling and methods of analysis. 2^a Ed. Canada.
- Chen, W. M., James, E. K., Coenye, T., Chou, J. H., Barrios, E., De Faria, S. M., Elliott, G. N., Sheu, S. Y., Sprent, J. I., Vandamme, P., 2006. *Burkholderia Mimosarum* Sp. Nov., isolated from root nodules of Mimosa Spp. from Taiwan and South America. *International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology*, 56, 1847–1851.
- Costa, L. E. O., Queiroz, M. V., Borges, A. C., Moraes, C. A., Araújo, E. F., 2012. Isolation and characterization of endophytic bacteria isolated from the leaves of the common bean (*Phaseolus Vulgaris*). *Brazilian Journal Of Microbiology*, 43, 1562-1575,.
- Crawford, D. L., Lynch, J. M., Whipps, J. M., Ousley, M. A., 1993. Isolation and characterization of Actinomycete antagonists of a fungal root pathogen. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 3899–3905.
- Dall’Agnol, R. F., Plotegher, F., Souza, R. C., Mendes, I. C., dos Reis Junior, F. B., Béna, G., Hungria, M. (2016). *Paraburkholderia nodosa* is the main N₂-fixing species trapped by promiscuous common bean (*Phaseolus vulgaris*L.) in the Brazilian “Cerradão.” *FEMS Microbiology Ecology*, 92.
- Dall’agnol, R. F., Plotegher, F., Souza, R. C., Mendes, I. C., Junior, F. B. R., Béna, G., Moulin, L., Hungria, M., 2016. *Paraburkholderia Nodosa* is the main n₂-fixing species trapped by promiscuous common bean (*Phaseolus Vulgaris* L.) in the Brazilian ‘Cerradão’, *Fems Microbiology Ecology*, 92.
- De Castro Pires, R., dos Reis Junior, F. B., Zilli, J. E., Fischer, D., Hofmann, A., James, E. K., & Simon, M. F., 2017. Soil characteristics determine the rhizobia in association with different species of Mimosa in central Brazil. *Plant and Soil*, 423, 1-2.
- De Meyer, S. E., De Beuf, K., Vekeman, B., Willems, A., 2015. A large diversity of non-rhizobial endophytes found in legume root nodules in Flanders (Belgium). *Soil Biology and Biochemistry*, 83, 1–11.

Devos, P., 2011. Multilocus Sequence Determination and Analysis, Methods In Microbiology. Academic Press, 38, 385–407.

Di Benedetto, N. A., Corbo, M. R., Campaniello, D., Cataldi, M. P., Bevilacqua, A., Sinigaglia, M., Flagella, Z., 2017. The role of plant growth promoting bacteria in improving nitrogen use efficiency for sustainable crop production: a focus on wheat. Aims Microbiology, 3, 413–434.

Edwards, J., Johnson, C., Santos-Medellin, C., Lurie, E., Podishetty, N.K. 2015. Structure, variation, and assembly of the root-associated microbiomes of rice. PNAS, 112, 911–920.

Elshahed, M. S., Youssef, N. H., Spain, A. M., Sheik, C., Najar, F. Z., Sukharnikov, L. O., Roe, B. A., Davis, J. P., Schloss, P. D., Bailey, V. L., Krumholz, L. R., 2008. Novelty and uniqueness patterns of rare members of the soil biosphere. Appl. Environ. Microbiol., 74, 5422–5428.

EMBRAPA., 2006. Sistema Brasileiro de Classificação de Solos. 2 ed., Brasília: Ministerio da Agricultura e Abastecimento.

Estrada-De-Los-Santos, P., Vinuesa, P., Martínez-Aguilar, L., 2013. Phylogenetic analysis of Burkholderia species by multilocus sequence analysis. Curr. Microbiol., 67, 51–60.

Fierer N., 2017. Embracing the unknown: disentangling the complexities of the soil microbiome. Nature Rev. Microbiol., 15, 579–90.

Fierer, N. and Jackson, R. B., 2006. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. P. Natl. Acad. Sci. USA 103, 626 –631.

Fierer, N., Jackson, R. B., 2006. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. Proc. Natl. Acad. Sci., 103, 626–63.

Filizola, H. F., Gomes, M. A. F., Souza, M. D. 2006. Manual de procedimentos de coleta de amostras em áreas agrícolas para análise da qualidade ambiental: solo, água e sedimentos. Embrapa Meio Ambiente Jaguariúna.

Garau, G., Yates, R. J., Deiana, P., Howieson, J. G. 2009. Novel strains of nodulating Burkholderia have a role in nitrogen fixation with papilionoid herbaceous legumes adapted to acid, infertile soils. Soil Biology And Biochemistry, 41, 125–134.

Gevers, D., Cohan, F. M., Lawrence, J. G., Spratt, B. G., Coenye, T., Feil, E. J., Stackebrandt, E., Peer, Y. V., Vandamme, P., 2005. Re-evaluating prokaryotic species. Nat Rev Microbiol, 3, 733–739.

Giongo, A., Passaglia, L. M. P., Freire, J. R. J., Sa´, E. L. S., 2007. Genetic diversity and symbiotic efficiency of population of rhizobia of *Phaseolus Vulgaris* L. in Brazil. Biol. Fertil. Soils, 43, 593-598.

- Gyaneshwar, P., Hirsch, A. M., Moulin, L., Chen, W-M., Elliott, G.N., Bontemps, C., Estrada-De-Los-Santos, P., Gross, E., Dos Reis, F. B., Sprent, J. I., Young, J. P. W., James, E. K., 2011. Legume-nodulating Beta-Proteobacteria: Cupriavidus diversity in Uruguayan Mimosa nodules. Applied and Environmental Microbiology Diversity, Host Range, And Future Prospects. Mol. Plant. Microbe Interact, 24, 1276 –1288.
- Hansel, C. M., Fendorf, S., Jardine, P. M., Francis, C. A., 2008. Changes in bacterial and archaeal community structure and functional diversity along a geochemically variable soil profile. Appl. Environ. Microbiol., 74, 1620–1633.
- Howieson, J. G., Dilworth, M. J., 2016. Working with rhizobia. Australian Centre For International Agricultural Research, Canberra.
- Hungria, M., Andrade, D. S., Chueire, L. M. D. O., Probanza, A., Guttierrez-Mañero, F. J., Megías, M., 2000. Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. Soil Biol. Biochem., 32, 1515–1528.
- Hungria, M., Andrade, D. S., Chueire, L. M. O., Probanza, A., Guttierrezmaero, F. J., Megas, M., 2000. Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus Vulgaris* L.) Rhizobia from Brazil. Soil Biol. Biochem., 32, 1515–1528.
- Hungria, M., Campo, R.J., Mendes, I.C., 2003. Benefits of inoculation of the common bean (*Phaseolus Vulgaris*) crop with efficient and competitive *Rhizobium tropici* strains. Biology and Fertility of Soils, New York, 39, 88-93.
- Kaur, C., Selvakumar, G., Ganeshamurthy, A. N., 2017. *Burkholderia to Paraburkholderia: The journey of a plant-beneficial-environmental bacterium*. Recent Advances in Applied Microbiology, 213–228.
- Kawaka F, Makonde H, Dida M, Opala P, Ombori O, Maingi J., 2018. Genetic diversity of symbiotic bacteria nodulating common bean (*Phaseolus Vulgaris*) in Western Kenya. Plos One, 13.
- Kaymak, H. C. 2011. Potential of PGPR in Agricultural Innovations. In: Maheshwari Dk. Plant Growth And Health Promoting Bacteria. Microbiol. Monographs.,18, 45–79.
- Kuzyakov, Y. and Blagodatskaya, E., 2015. Microbial hotspots and hot moments in soil: Concept & review. Soil Biol. Biochem., 83, 184–199.
- Lajudie, P., Laurent-Fulele, E., Willems, A., Torck, U., Coopman, R., Collins, M. D., Kersters, K., Dreyfus, B., Gillis, M., 1998. *Allorhizobium undicola* Gen. Nov., Sp. Nov., nitrogen-fixing bacteria that efficiently nodulate *Neptunia natans* in Senegal. Int. J. Syst. Bacteriol., 48, 1277–1290.
- Lane, D.J., Pace, B., Olsen, G. J., Stahl, D. A., Sogin, M. L., Pace, N. R. 1985. Rapid determination of 16S Ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. Proceedings Of The National Academy Of Science.

- Lauber, C. L., Strickland, M. S., Bradford, M. A., Fierer, N., 2008. The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types. *Soil Biol. Biochem.*, 40, 2407–2415.
- Lombard, N., Prestat, E., Van Elsas J. D., Simonet, P., 2011. Soil-specific limitations for access and analysis of soil microbial communities by metagenomics. *Fems Microbiol. Ecol.*, 78, 31–49.
- Lyra, M. C. C. P., Freitas, A. D. S., Silva, M. L. R. B., Bezerra, R. D. V., Silva, V. D. S. G., Silva, A. F., Santos, C. E. D. R. E. S., 2019. Diversity of rhizobia isolated from nodules of indigenous tree legumes from the Brazilian Dry Forest. *Acta. Agronómica*, 68.
- Macdonald, T.L., Martin, R. B. 1988. Aluminium ion in biological systems. *Trends Biochem. Sci.*, 13, 15-19.
- Madigan, M., Martinko, J., 2005. *Brock biology of microorganisms*, 11 ed. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ.
- Maiden, M. C., 2006. Multilocus sequence typing of bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, 60, 561–588.
- Maiden, M. C., Bygraves, J. A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J. E., Urwin, R., 1998. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95, 3140–5.
- Masson-Boivin, C., Giraud, E., Perret, X., Batut, J., 2009. Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many *Rhizobium* recipes? *Trends Microbiol.*, 17, 458-466.
- Mengel, K., Kirkby, E. A. 1987. *Principles of plant nutrition*, 4^a Ed., Bern.
- Mommer, L., Kirkegaard, J. and van Ruijven, J., 2016. Root–root interactions: towards a rhizosphere framework. *Trends Plant Sci.*, 21, 209–217.
- Mora, M. De La L., Demanet, R., Acuña, J. J., Viscardi, S., Jorquera, M., Rengel, Z., & Durán, P., 2017. Aluminum-tolerant bacteria improve the plant growth and phosphorus content in ryegrass grown in a volcanic soil amended with cattle dung manure. *Applied Soil Ecology*, 115, 19–26.
- Mora, Y., Díaz, R., Vargas-Lagunas, C., Peralta, H., Guerrero, G., Aguilar, A., 2014. Nitrogen-fixing rhizobial strains isolated from common bean seeds. *Phylogeny, Physiology, And Genome Analysis.*, 80, 5644–54.
- MOREIRA, F. M. S., SIQUEIRA, J. O., 2006. *Microbiologia e Bioquímica do Solo*. 2 ed., Lavras: UFLA.
- Narasimhan, K., Basheer, C., Bajic, V.B., and Swarup, S. 2003. Enhancement of Plant–microbe interactions using a rhizosphere metabolomics-driven approach and its application in the removal of polychlorinated biphenyls. *Plant Physiol.*, 132, 146–

153.

Oldroyd, G. E. D., 2013. Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nature Reviews Microbiology*, 11, 252–263.

Oliveira, A. L. M., Urquiaga, S., Baldani, J. I., 2003. Processos e mecanismos envolvidos na influência de microrganismos sobre o crescimento vegetal. *Embrapa Agrobiologia, Documentos* 161.

Onyango, B., Beatrice, A., Regina, N., Koech, P., Skilton, R., Francesca, S. 2015. Morphological, genetic and symbiotic characterization of root nodule bacteria isolated from bambara groundnuts (*Vigna Subterranea L. Verdc*) from soils of Lake Victoria Basin, Western Kenya. *J. Appl. Biol. Biotechnol.*, 3, 1–10.

Orrell, P., Bennett, A. E., 2013. How can we exploit above-belowground interactions to assist in addressing the challenges of food security? *Front. Plant Sci.*, 4, 432.

Pandya, M., Naresh Kumar, G., Rajkumar, S., 2013. Invasion of rhizobial infection thread by non-rhizobia for colonization of *Vigna adiata* root nodules. *Fems Microbiol. Lett.*, 348, 58–65,.

Paulitsch, F., Klepa, M. S., Da Silva, A. R., Do Carmo, M. R. B., Dall'agnol, R. F., Delamuta, J. R. M., Da Silva Batista, J. S., 2018. Phylogenetic diversity of rhizobia nodulating native mimosa gymnas grown in a south brazilian ecotone. *Molecular Biology Reports*.

Pavan, M. A., Bloch, M. F., Zempulski, H. C., Miyazawa M., Zocoler D.C., 1992. *Manual de análise química de solo e controle de qualidade*. IAPAR, Londrina.

Peix, A., Ramírez-Bahena, M. H., Velázquez, E., Bedmar, E. J., 2015. Bacterial associations with legumes. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 34, 17–42.

Quirino, B. F., Pappas, G. J., Tagliaferro, A. C., Collevatti, R. G., Neto, E. L., da Silva, M. R., Bustamante, M. M., Krüger, R. H., 2009. Molecular phylogenetic diversity of bacteria associated with soil of the savanna-like Cerrado vegetation. *Microbiol. Res.*, 164, 59–70

Rajnovic, I., Ramírez-Bahena, M. H., Sánchez-Juanes, F., González-Buitrago, J. M., Kajic, S., Peix, Á., Sikora, S., 2019. Phylogenetic diversity of rhizobia nodulating *Phaseolus Vulgaris* in Croatia and definition of the symbiovar *Phaseoli* within the species *Rhizobium Pisi*. *Systematic and Applied Microbiology*.

Roesch, L. F., Fulthorpe, R. R., Riva, A., Casella, G., Hadwin, A. K., Kent, A. D., Daroub, S. H., Camargo, F. A., Farmerie, W. G., Triplett, E. W., 2007. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *ISME J.*, 1, 283–290.

Sambrook, J., Russell, D. W., 2001. *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. 3^a Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Schutter, M. E., Sandeno, J. M., Dick, R. P., 2001. Seasonal, soil type, and alternative management influences on microbial communities of vegetable cropping systems. *Biol. Fertil. Soils*, 34, 397–410.
- Shamseldin, A., Abdelkhalek, A., Sadowsky, M. J., 2016. Recent changes to the classification of symbiotic, nitrogen-fixing, legume-associating bacteria: a review. *Symbiosis*, 71, 91–109.
- Shi, S., Richardson, A. E., O'Callaghan, M., DeAngelis, K. M., Jones, E. E., Stewart, A., 2011. Effects of selected root exudate components on soil bacterial communities. *FEMS Microbiology Ecology*, 77, 600–610.
- Sinsuwongwat, S., Nuntagij, A., Shutsrirung, A., Nomura, M., Tajima, S., 2002. Characterization of local rhizobia in Thailand and distribution of malic enzymes. *Soil Sci. Plant. Nutr.*, 48, 719–727.
- Spilker, T., Baldwin, A., Bumford A. 2009. Expanded multi locus sequence typing for *Burkholderia* species. *J. Clin. Microbiol.*, 47, 2607–2610.
- Stacey, G., 2007. The *Rhizobium*-Legume nitrogen-fixing symbiosis. *Biology of the Nitrogen Cycle*, 147–163.
- Taghavi, S., Van Der Lelie, D., Hoffman, A., Zhang, Y. B., Walla, M. D., Vangronsveld, J., Monchy, S., 2010. Genome sequence of the plant growth promoting endophytic bacterium *Enterobacter* Sp. 638. *Plos Genetics*, 6.
- Tak, N., Gehlot, H. S. 2019. Diversity of nitrogen-fixing symbiotic rhizobia with special reference to indian Thar desert. *Microbial Diversity In Ecosystem Sustainability And Biotechnological Applications*. Singapore.
- Torres, A. R., Cursino, L., Muro-Abad, J. I., Gomes, E. A., Araújo, E. F., Hungria, M., Cassini, S. T. A., 2009. Genetic diversity of indigenous common bean (*Phaseolus Vulgaris* L.) rhizobia from the state of Minas Gerais, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40, 852-856.
- Uren, N.C., 2000. Types, amounts, and possible functions of compounds released into the rhizosphere by soil-grown plants. In *The rhizosphere: biochemistry and organic substances at the soil–plant interface*. Marcel Dekker, Inc., New York., 19–40.
- Valverde, A., Igual, J., Peix, A., Cervantes, E., Velázquez, E., 2006. *Rhizobium Lusitanum* Sp. Nov. A bacterium that nodulates *Phaseolus Vulgaris*. *International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology*, 56, 2631-2637.
- Vandamme, P. and Dawyndt, P., 2011. Classification and identification of the *Burkholderia cepacia* complex: past, present and future. *Syst. Appl. Microbiol.*, 34, 87–95.
- Vincent, J. M., 1970. A manual for the study of root nodule bacteria. Blackwell Scientific Publs, London.

Weinert, N., Piceno, Y., Ding, G., 2011. Phylochip hybridization uncovered an enormous bacterial diversity in the rhizosphere of different potato cultivars: many common and few cultivar-dependent taxa. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 75, 497–506.

Willems A., 2006. The taxonomy of rhizobia: an overview. *Plant Soil*, 287, 3–14.

Wu, T., Chellemi, D. O., Graham, J. H., Martin, K. J., Roskopf, E. N., 2008. Comparison of soil bacterial communities under diverse agricultural land management and crop production practices. *Microb. Ecol.*, 55, 293–310.

Xia, Y., Debolt, S., Dreyer, J., Scott, D., Williams, M. A., 2015. Characterization of culturable bacterial endophytes and their capacity to promote plant growth from plants grown using organic or conventional practices. *Front Plant. Sci.*, 6, 490.

Xun, W., Huang, T., Zhao, J., Ran, W., Wang, B., Shen, Q., 2015. Environmental conditions rather than microbial inoculum composition determine the bacterial composition, microbial biomass and enzymatic activity of reconstructed soil microbial communities. *Soil Biol. Biochem.*, 90, 10–18.

Young, J. P. W., Haukka, K.E., 1996. Diversity and phylogeny of rhizobia. *New Phytol.*, 133, 87–94.

Zahran, H. H., 2017. Plasmids impact on rhizobia-legumes symbiosis in diverse environments. *Symbiosis*, 73, 75–91.

Zhang, Y.F., Wang, E.T., Tian, C.F., Wang, F.Q., Han, L.L., Chen, W.F., Chen, W.X., 2008. *Bradyrhizobium elkanii*, *Bradyrhizobium yuanmingense* and *Bradyrhizobium japonicum* are the main rhizobia associated with *Vigna unguiculata* and *Vigna radiata* in the subtropical region of China. *Fems Microbiol. Lett.*, 285, 146–154.

Zhong, W., Gu, T., Wang, W., Song, B., Lin, X., Huang, Q., 2010. The effects of mineral fertilizer and organic manure on soil microbial community and diversity. *Plant Soil*, 326, 511–522.

Anexos

Anexo I. Solução nutritiva para cultivo de leguminosas em vasos de Leonard

Solução estoque	Reagentes	g/L
1	CaCl ₂ -2H ₂ O	294,1
2	KH ₂ PO ₄	136,09
	Fe-EDTA	4,47
3	MgSO ₄ -7H ₂ O	123,3
	K ₂ SO ₄	87,0
	MnSO ₄ -H ₂ O	0,206
	H ₃ BO ₃	0,247
	ZnSO ₄ -7H ₂ O	0,288
4	CuSO ₄ -5H ₂ O	0,100
	CoSO ₄ -7H ₂ O	0,056
	NaMoO ₂ -2H ₂ O	0,048

Anexo 2. Classificação e código de acesso dos isolados obtidos de raízes de feijão (*P. vulgaris*) obtidos de três solos do Paraná.

Isolado	Local	Grupo Taxonômico	Espécie próxima/Código de Acesso
O1	Ortigueira	β -Proteobacteria; Burkholdericeae	<i>Ralstonia pickettii</i> MN988911
O2	Ortigueira	γ -Proteobacteria <i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Kosakonia oryzae</i> MN988926
O3	Ortigueira	γ -Proteobacteria <i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Enterobacter asburiae</i> MT012116
O4	Ortigueira	β -Proteobacteria; Burkholdericeae	<i>Herbaspirillum huttiense</i> MN988895
O5	Ortigueira	γ -Proteobacteria <i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Enterobacter kobei</i> MT012117
O6	Ortigueira	γ -Proteobacteria <i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Enterobacter asburiae</i> MT012118
O7	Ortigueira	γ -Proteobacteria <i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Enterobacter asburiae</i> MT012119
O8	Ortigueira	γ -Proteobacteria <i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Enterobacter asburiae</i> MT012121
O9	Ortigueira	γ -Proteobacteria <i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Enterobacter asburiae</i> MT012122
O10	Ortigueira	γ -Proteobacteria <i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Enterobacter asburiae</i> MN988879
O11	Ortigueira	γ -Proteobacteria <i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Enterobacter asburiae</i> MN988880
O12	Ortigueira	γ -Proteobacteria <i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i> MN988902
O13	Ortigueira	γ -Proteobacteria <i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Enterobacter asburiae</i> MT012123
O14	Ortigueira	β -Proteobacteria; Burkholdericeae	<i>Herbaspirillum huttiense</i> MN988896
O15	Ortigueira	γ -Proteobacteria <i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i> MN988903
O16	Ortigueira	γ -Proteobacteria <i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i> MT012126

O17	Ortigueira	γ -Proteobacteria <i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i> MT012127
O18	Ortigueira	γ -Proteobacteria <i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Kosakonia radicincitans</i> MT012128
O19	Ortigueira	<i>Firmicutes; Bacillaceae</i>	<i>Bacillus tequilensis</i> MN988863
O20	Ortigueira	γ -Proteobacteria <i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Enterobacter asburiae</i> MN988881
O21	Ortigueira	γ -Proteobacteria <i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Enterobacter asburiae</i> MN988882
O22	Ortigueira	γ -Proteobacteria <i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Enterobacter asburiae</i> MN988883
O23	Ortigueira	γ -Proteobacteria <i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Enterobacter asburiae</i> MN988884
O24	Ortigueira	γ -Proteobacteria <i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Kosakonia oryzae</i> MN988926
O25	Ortigueira	β -Proteobacteria; Burkholderiaceae	<i>Ralstonia pickettii</i> MN988913
O26	Ortigueira	<i>Firmicutes; Bacillaceae</i>	<i>Bacillus tequilensis</i> MN988864
O27	Ortigueira	β -Proteobacteria; Chromobacteriaceae	<i>Aquitalea denitrificans</i> MN988674
O28	Ortigueira	Actinobacteria; Microbacteriaceae	<i>Curtobacterium citreum</i> MN988878
O29	Ortigueira	β -Proteobacteria; Burkholderiaceae	<i>Ralstonia pickettii</i> MN988912
O30	Ortigueira	γ -Proteobacteria <i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Enterobacter asburiae</i> MT012120
U1	Londrina	β -Proteobacteria; Burkholderiaceae	<i>Paraburkholderia diffusa</i> MN988866
U2	Londrina	γ -Proteobacteria <i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Pseudomonas nitroreducens</i> MN988909
U3	Londrina	γ -Proteobacteria <i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Enterobacter asburiae</i> MN988892
U4	Londrina	γ -Proteobacteria; <i>Xanthomonadaceae</i>	<i>Stenotrophomonas pavanii</i> MN988920

U5	Londrina	γ -Proteobacteria <i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Enterobacter asburiae</i> MN988893
U6	Londrina	γ -Proteobacteria <i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Pantoea anthophila</i> MN988905
U7	Londrina	γ -Proteobacteria <i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Pantoea allii</i> MN988906
U8	Londrina	<i>Firmicutes; Bacillaceae</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i> MN988919
U9	Londrina	β -Proteobacteria; Burkholdericeae	<i>Paraburkholderia diffusa</i> MN988865
U10	Londrina	γ -Proteobacteria <i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Pantoea allii</i> MN988907
U11	Londrina	β -Proteobacteria; Burkholdericeae	<i>Cupriavidus metallidurans</i> MN988877
U12	Londrina	γ -Proteobacteria <i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Pseudomonas monteillii</i> MN988910
U13	Londrina	γ -Proteobacteria <i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Enterobacter asburiae</i> MN988894
U14	Londrina	<i>Actinobacteria;</i> <i>Cellulomonadaceae</i>	<i>Cellulomonas pakistanensis</i> MN988875
P1	Ponta Grossa	β -Proteobacteria; Burkholdericeae	<i>Ralstonia pickettii</i> MN988914
P2	Ponta Grossa	β -Proteobacteria; Burkholdericeae	<i>Herbaspirillum huttiense</i> MN988897
P3	Ponta Grossa	β -Proteobacteria; Burkholdericeae	<i>Paraburkholderia mimosarum</i> MN988872
P4	Ponta Grossa	α -Proteobacteria; <i>Rhizobiaceae</i>	<i>Rhizobium pisi</i> MN988921
P5	Ponta Grossa	β -Proteobacteria; Burkholdericeae	<i>Paraburkholderia mimosarum</i> MN988871
P6	Ponta Grossa	α -Proteobacteria; <i>Methylocystaceae</i>	<i>Methylovirgula ligni</i> MN988908
P7	Ponta Grossa	α -Proteobacteria; <i>Rhizobiaceae</i>	<i>Rhizobium phaseoli</i> MT012124
P8	Ponta Grossa	γ -Proteobacteria <i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Enterobacter asburie</i> MT012125

P9	Ponta Grossa	β -Proteobacteria; Burkholdericeae	<i>Ralstonia insidiosa</i> MN988915
P10	Ponta Grossa	β -Proteobacteria; Burkholdericeae	<i>Burkholderia arboris</i> MN988874
P11	Ponta Grossa	γ -Proteobacteria <i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Enterobacter asburiae</i> MN988888
P12	Ponta Grossa	γ -Proteobacteria <i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Enterobacter asburiae</i> MN988889
P13	Ponta Grossa	β -Proteobacteria; Burkholdericeae	<i>Paraburkholderia mimosarum</i> MN988873
P14	Ponta Grossa	β -Proteobacteria; Burkholdericeae	<i>Paraburkholderia mimosarum</i> MN988869
P15	Ponta Grossa	γ -Proteobacteria <i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Pseudomonas monteillii</i> MN988910
P16	Ponta Grossa	γ -Proteobacteria <i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Enterobacter asburiae</i> MN988885
P17	Ponta Grossa	β -Proteobacteria; Burkholdericeae	<i>Herbaspirillum huttiense</i> MN988898
P18	Ponta Grossa	β -Proteobacteria; <i>Comamonadaceae</i>	<i>Comamonas testosteroni</i> MN988927
P19	Ponta Grossa	β -Proteobacteria; Burkholdericeae	<i>Herbaspirillum huttiense</i> MN988900
P20	Ponta Grossa	β -Proteobacteria; Burkholdericeae	<i>Paraburkholderia mimosarum</i> MN988870
P21	Ponta Grossa	γ -Proteobacteria <i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Raoultella planticola</i> MN988916
P22	Ponta Grossa	β -Proteobacteria; Burkholdericeae	<i>Herbaspirillum huttiense</i> MN988901
P23	Ponta Grossa	γ -Proteobacteria <i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Citrobacter youngae</i> MN988876
P24	Ponta Grossa	β -Proteobacteria; Burkholdericeae	<i>Herbaspirillum huttiense</i> MN988899
P25	Ponta Grossa	γ -Proteobacteria <i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Enterobacter asburiae</i> MN988886
P26	Ponta Grossa	β -Proteobacteria; Burkholdericeae	<i>Paraburkholderia nodosa</i> MN988868

P27	Ponta Grossa	β -Proteobacteria; Burkholdericeae	<i>Paraburkholderia mimosarum</i> MN988867
P28	Ponta Grossa	γ -Proteobacteria <i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Raoultella planticola</i> MN988917
P29	Ponta Grossa	γ -Proteobacteria <i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Enterobacter asburiae</i> MN988890
P30	Ponta Grossa	γ -Proteobacteria <i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Enterobacter asburiae</i> MN988891
P31	Ponta Grossa	γ -Proteobacteria; <i>Xanthomonadaceae</i>	<i>Stenotrophomonas pavanii</i> MN988920
P32	Ponta Grossa	γ -Proteobacteria <i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Enterobacter asburiae</i> MN988904
P33	Ponta Grossa	γ -Proteobacteria <i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Raoultella planticola</i> MN988918
